



**Liliana Rodrigues De Matos**

Licenciatura em Produção Alimentar e Restauração

**Microbiologia Preditiva  
Aplicada à análise de amostras de carne de  
vaca e porco**

Dissertação para obtenção do Grau de  
Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

**Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, FCT-  
UNL**

**Co-orientadora: Engenheira Ana Machado, SGS**

**Júri:**

**Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes**

**Arguente: Prof. Doutora Elisabete Muchagato Maurício**

**Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte**



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Setembro de 2014**



**Liliana Rodrigues De Matos**

Licenciatura em Produção Alimentar e Restauração



**Microbiologia Preditiva  
Aplicada à análise de amostras de carne de  
vaca e porco**

Dissertação para obtenção do Grau de  
Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

**Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, FCT-UNL  
Co-orientadora: Engenheira Ana Machado, SGS**

**Júri:**

**Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes**

**Arguente: Prof. Doutora Elisabete Muchagato Maurício**

**Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte**



**Setembro de 2014**



“Microbiologia Preditiva aplicada a amostras de carne de vaca e porco”, Copyright de Liliana  
Rodrigues de Matos, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor



## AGRADECIMENTOS

Neste espaço agradeço de forma mais sincera e sentida a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Em primeira estância, os meus agradecimentos dirigem-se à Sociedade Geral de Superintendência – SGS, S.A. por possibilitar a realização desta dissertação.

Agradeço pela oportunidade, disponibilidade e auxílio à Engenheira Ana Machado.

À Professora Benilde Mendes, Professora Doutora Coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da FCT-UNL, agradeço a disponibilidade, o apoio, a preocupação e toda a dedicação e boa vontade.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte, agradeço o apoio, a confiança, a disponibilidade, a amabilidade, a instrução, a sua perseverança e os seus pareceres durante toda a etapa de desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço a todos os professores da FCT, que acompanharam este meu percurso académico, pela devoção e por me lisonjearam com os seus conhecimentos.

Um obrigado a todas as pessoas que acompanharam o meu estágio na empresa SGS, nomeadamente, à Sandra, Carmen, Laura, Alice, Lurdes, pela receção, pela boa vontade e pelos conhecimentos transmitidos e à Rosa, Andreia, Tanya, Fátima, João e Tiziana pelo companheirismo, apoio e amizade.

Um agradecimento especial às minhas amigas e companheiras de estágio e mestrado Ana, Andreia e Tatiana, pelo apoio, pela amizade, pelo companheirismo, pela diversão, pela motivação e incentivo, pelo voto de confiança, por acreditarem e por enriquecerem e tornarem intemporal esta fase da minha vida. Um muito obrigado á Ana pela amizade, pela insistência, pelos conselhos, pela ajuda e por sempre acreditar em mim.

Agradeço sinceramente aos meus companheiros e amigos: Marta, Beatriz, João Jesus, Diogo, Ana, Andreia e Tatiana pelos bons momentos, pelo apoio, pela alegria e diversão. Desejo-vos um futuro cheio de sucesso.

Agradeço de forma especial ao Ivo, pela compreensão, pelo apoio, pela dedicação, pela paciência, pela motivação e orgulho e principalmente pelo amor e amizade que me lisonjearam em mais uma fase da minha vida e que de certa forma, permitiu que a ultrapassa-se com sucesso.

À minha maravilhosa família, um agradecimento incondicional por tornarem a concretização desta etapa possível, pelo apoio, pelo amor, pelo carinho e pelo voto de confiança. À minha irmã pela insistência e por acreditar em mim e nas minhas capacidades, pelos conselhos valiosos, por

ser o meu braço direito, pela dedicação, amizade, ajuda, por ser uma irmã admirável e uma mulher de sucesso. À minha espantosa mãe, por tornar isto tudo possível, por me incentivar à realização deste mestrado e desta dissertação, por me consagrar todas as condições necessárias para tal, pelo apoio infindável, pela dedicação, pelos conselhos e pelo amor incondicional. Obrigado por tudo mãe.



## RESUMO

A microbiologia preditiva é a conjugação de conhecimentos provenientes de disciplinas como a matemática, estatística e os sistemas de informação e tecnologia que pretende providenciar modelos preditivos que prevejam o comportamento microbiano em ambientes alimentares, de forma a poder prevenir a deterioração dos géneros alimentares bem como as doenças de origem alimentar.

Os modelos preditivos primários, secundários e terciários são aplicados no intuito de melhorar a qualidade e segurança alimentar e particularmente os terciários, podem ser utilizados como ferramentas auxiliaadoras na área de HACCP; é necessário ter em conta que estes modelos são uma representação muito simplificada da realidade, que possuem limitações devido á complexidade do comportamento microbiano e dos ambientes alimentares, podendo por isto estimar previsões que se desviem das situações reais.

O presente trabalho tem como principal objectivo averiguar a aplicabilidade da microbiologia preditiva, particularmente, dos modelos terciários ou *softwares* preditivos, na análise de amostras de carne de vaca e porco armazenadas a 5°C e 10°C, comparando os resultados obtidos através da análise microbiológica clássica, realizada no laboratório de microbiologia da empresa SGS, com os resultados obtidos das previsões provenientes de dois *softwares* preditivos, nomeadamente, ComBase Predictor e PMP (Pathogen Modeling Program). Para tal, foram realizadas análises microbiológicas, por forma a realizar contagens de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella* e análises químicas para analisar o pH,  $a_w$  e NaCl de 20 amostras de carne de vaca e 20 amostras de carne de porco Adicionalmente foram efetuadas contagens de microrganismos totais a 30°C.

Os resultados demonstraram que a ferramenta preditiva ComBase conseguiu efectuar melhores previsões para o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* em amostras de carne de vaca e de porco do que a ferramenta preditiva PMP. Contudo, mesmo sendo melhor, as previsões efectuadas pelo programa apresentaram desvios em relação às contagens reais que muito provavelmente se relacionam com a existência da flora de decomposição. Os resultados estimados pela ferramenta PMP foram sempre muito mais elevados do que os resultados obtidos na análise microbiológica laboratorial, o que demonstrou a sua não aplicabilidade a este tipo de amostras.

**Palavras-chave:** Microbiologia Preditiva, Modelos Terciários, ComBase, PMP, Análise Microbiológica, Carne vaca, Carne porco



## ABSTRACT

Predictive microbiology is the association of traditional microbiology knowledge with those found in the disciplines as mathematics, statistics and information systems and technology which aims the construction of predictive models that predict microbial behavior in order to prevent food spoilage as well as food-borne illnesses.

Primary, secondary and tertiary predictive models are applied in order to improve microbial food quality and safety, specially de tertiary, can be used as HACCP support tools; it is necessary taking into account that these models are simplified representations of reality and have limitations caused by the complexity of the microbial behavior in food systems and therefore can deviate from real conditions.

The main objective of this work is to verify the tertiary models or predictive *softwares* applicability in the analysis of beef and pork samples stored in 5°C and 10°C, by comparing results from traditional microbiology analysis held in SGS laboratory with the outcome of two predictive *softwares*, namely, ComBase and PMP predictor (Pathogen Modeling Program). For this purpose, microbiological analyzes were performed to enumerate *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* and *Salmonella* detection and chemical analyzes were done to assay pH,  $a_w$  e NaCl in 20 beef and 20 pork samples. Additionally, microorganisms at 30°C were enumerated.

Results showed that the ComBase predictive tool managed to do better predictions, for the growth of *E.coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* in beef and pork samples, than de PMP predictive tool. However, despite being better, Combace predictions showed deviations compared with the real counts that most likely relate to the existence of the decomposition flora. Results estimated by the PMP predictive tool, were always much higher than the results obtained in the laboratory microbiological analysis, which demonstrated its inapplicability to this type of samples.

**Keywords:** Preditive Microbiology, Tertiary Models, ComBase, PMP, Microbiology Analysis, beef, pork



# ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>1. OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Estrutura.....	2
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 História da microbiologia preditiva .....	3
2.2 Microbiologia Preditiva .....	4
2.2.1 Aplicações da microbiologia preditiva .....	5
2.2.2. Microbiologia preditiva e HACCP .....	5
2.3 Fatores intrínsecos e extrínsecos.....	6
2.3.1 Fatores intrínsecos .....	6
2.3.2 Fatores extrínsecos .....	10
2.4 Fases de desenvolvimento microbiano.....	12
2.5 Microrganismos Relevantes .....	14
2.5.1 <i>Salmonella</i> spp. ....	16
2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.5.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
2.5.4 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.7 Modelos da microbiologia preditiva.....	21
2.7.1 <i>Softwares</i> preditivos.....	22
2.7.1.1 Pathogen Modeling Program (PMP).....	23
2.7.1.2 ComBase Predictor .....	25
2.7.2 Limitações dos modelos preditivos .....	30
2.7.3 Desafios da microbiologia preditiva e ferramentas preditivas .....	30
2.7.4 Perspectivas futuras para os modelos preditivos .....	31
<b>3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA .....</b>	<b>33</b>
3.1 SGS – Sociedade Geral de Superintendência, S.A. ....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>

4.1 Obtenção das amostras .....	35
4.2 Preparação de meios de cultura.....	36
4.2.1.BPW (Buffered peptone water/ Água peptonada tamponada) (Bio-Rad®) ....	36
4.2.2.½ Fraser com suplemento ½ Fraser (Bio-Rad®).....	36
4.2.3.TBX (Tryptone-bile X-glucuronic/ triptona-bilís X-glucurónico) (Bio-Rad®)....	37
4.2.4 BPM (Baird Parker Medium) (Bio-Rad®) com suplemento gema de ovo telurite (Egg Yolk Tellurite/ Gema de ovo telurite- Oxoid®) e RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen/ Plasma Fibrinogénio de Coelho) (Bio-Rad®).....	38
4.2.5. PCA (Plate Count Agar) (Bio-Rad®) .....	39
4.2.6.AL (Agar Listeria) (Bio-Rad®) .....	40
4.2.7.RLM (Rapid L'Mono) (Bio-Rad®) .....	41
4.2.8.RV (Rappaport Vassiliadis) (Merck ®).....	42
4.3 Métodos de enumeração e determinação dos microrganismos .....	42
4.3.1-Método Horizontal de Enumeração de <i>Escherichia coli</i> de acordo com a ISO 16649-1 de 2001.....	42
4.3.2- Método Horizontal de Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com a ISO 6888-2 de 1999.....	43
4.3.3- Método Horizontal de Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> de acordo com a ISO 11290-2 de 1998 e respetiva retificação 1 de 2004.....	43
4.3.4- Método Horizontal de Detecção de <i>Salmonella</i> spp. de acordo com a ISO 6579 e respetiva retificação 1 de 2007. ....	44
4.3.5 Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Totais a 30°C, segundo a ISO 4833 de 2003. ....	44
4.4-Cálculos .....	45
4.5-Delineamento Experimental .....	45
4.6-Aplicação dos Softwares Preditivos PMP e ComBase.....	46
<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1. Resultados das análises às amostras de carne de vaca e de porco.....	49
5.2. Aplicação das ferramentas preditivas para previsão do crescimento dos microrganismos nas amostras de carne de vaca.....	53
5.3. Aplicação das ferramentas preditivas para previsão do crescimento dos microrganismos nas amostras de carne de porco .....	66
5.4. Análise Global dos resultados .....	92
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>105</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1-Exemplo de uma curva de crescimento microbiano em função da variação do pH (adaptado de Oliveira, 2009). .....	7
Figura 2.2-Exemplo de curva de crescimento microbiano (Pampulha, 1998; Oliveira, 2009). .....	13
Figura 2.3-Distribuição de surtos de origem alimentar por categoria de alimentos na União Europeia em 2012 (EFSA/ECDC, 2014). .....	15
Figura 2.4-Alguns exemplos de modelos primários que medem a resposta dos microrganismos (adaptado de Fakruddin et al., 2011). .....	22
Figura 2.5-Página inicial do PMP online, seleção do modelo preditivo consoante os modelos e respetivos microrganismos (adaptado de ARS.USDA, 2014). .....	23
Figura 2.6-Página inicial do PMP online, seleção do modelo preditivo consoante os microrganismos e modelos (adaptado de ARS.USDA, 2014). .....	24
Figura 2.7-Exemplo dos resultados de uma previsão pelo PMP online (adaptado de ARS.USDA, 2014). .....	24
Figura 2.8-Página inicial do programa ComBase online (adaptado de ComBase, 2014). .....	26
Figura 2.9-Página, após login, dos modelos preditivos na plataforma online do ComBase (adaptado de ComBase, 2014). .....	26
Figura 2.10-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com seleção do microrganismo pretendido (adaptado de ComBase, 2014). .....	27
Figura 2.11-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com introdução estática de dados e apresentação do resultado em gráfico (adaptado de ComBase, 2014). .....	28
Figura 2.12-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com introdução dinâmica de dados (adaptado de ComBase, 2014). .....	28
Figura 2.13-Exemplo da página do modelo de crescimento da ferramenta ComBase Predictor online, apresentação do resultado em quadro (adaptado de ComBase, 2014). .....	29
Figura 2.14-Exemplo da página do modelo de crescimento da ferramenta ComBase Predictor online, apresentação de 4 previsões em simultâneo (adaptado de ComBase, 2014) .....	29
Figura 3.1-Logotipo da empresa SGS, S.A. ....	34
Figura 5.1-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra A10.1, durante 144 horas, representando a linha vermelha a temperatura de 10°C. ....	55
Figura 5.2-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra A10.11, durante 144 horas. ....	56
Figura 5.3-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>S. aureus</i> , na amostra A10.12, durante 144 horas. ....	58
Figura 5.4-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>S. aureus</i> , na amostra A10.12, durante 144 horas. ....	59
Figura 5.5-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.13, durante 144 horas. ....	61
Figura 5.6-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase, do crescimento de <i>E. coli</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B), na amostra A10.13, durante 144 horas. ....	62

Figura 5.7-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>S. aureus</i> , na amostra A10.13, durante 144 horas.....	63
Figura 5.8-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.15, durante 144 horas. ....	64
Figura 5.9-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.16, durante 144 horas. ....	66
Figura 5.10-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.3, durante 144 horas. ....	68
Figura 5.11-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra B10.4, durante 144 horas.....	70
Figura 5.12-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.6, durante 144 horas. ....	71
Figura 5.13-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.7, durante 144 horas. ....	73
Figura 5.14-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> na B5.8 (A) e B10.8 (B), durante 144 horas. ....	74
Figura 5.15-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> na amostra B5.8 (A) e B10.8 (B) durante 144 horas.	75
Figura 5.16-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.10, durante 144 horas. ....	76
Figura 5.17-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B5.10 (A) e B10.10 (B), durante 144 horas. ....	77
Figura 5.18-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B5.10 (A) e B10.10 (B), durante 144 horas.- .....	78
Figura 5.19-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.13, durante 144 horas. ....	80
Figura 5.20-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.13, durante 144. ....	81
Figura 5.21-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.15, durante 144 horas. ....	82
Figura 5.22-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.16, durante 144 horas. ....	84
Figura 5.23-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B5.18 (A) e B10.18 (B), durante 144 horas. ....	85
Figura 5.24-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , na amostra B5.18 (A) e B10.18 (B), durante 144 horas. ....	86
Figura 5.25-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.19, durante 144 horas. ....	88
Figura 5.26-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.19, durante 144. ....	88
Figura 5.27-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.19, durante 144 horas. ....	89
Figura 5.28-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.20, durante 144 horas. ....	90



Figura 5.29-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.20, durante 144 horas. ....	91
Figura 5.30-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.20, durante 144 horas. ....	92
Figura 8.1-Equipamento KITTY .....	115
Figura 8.2-saída de placas do equipamento KITTY .....	116
Figura 8.3-Amostras de carne de porco, já diluídas em BPW e respetivas placas, para posterior contagem de <i>S.aureus</i> .....	117
Figura 8.4-Exemplo de placa de PCA, para contagem de microrganismos totais a 30°C .....	118
Figura 8.5-Exemplo de placa de TBX,com crescimento de colónias típicas de <i>E.coli</i> (PVL, 2014) .....	118
Figura 8.6-Exemplo de placa de BPM+RPF,com crescimento de colónias típicas de <i>S.aureus</i> (Biosystems 2014) .....	119
Figura 8.7-Exemplo de placa de AL,com crescimento de colónias típicas de <i>L.monocytogenes</i> (Bio-Rad, 2014 c).....	119
Figura 8.8-Exemplo de placa de RLM,com crescimento de colónias típicas de <i>L.monocytogenes</i> (Bio-Rad,2014d).....	120



## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 2.1-Aplicações da microbiologia preditiva (adaptado de Fakruddin et al., 2011).	5
Quadro 2.2-Comparação entre Microbiologia Preditiva e HACCP (adaptado de Fakruddin et al., 2011).	6
Quadro 2.3-Valores mínimos de pH necessários para o desenvolvimento de alguns microrganismos (adaptado de Jay, 2000; Oliveira 2009)	7
Quadro 2.4-Valores de aw para o crescimento de alguns microrganismos patogênicos em alimentos (adaptado de FDA, 2014).	8
Quadro 2.5-Classificação dos microrganismos consoante as exigências de temperatura (adaptado de Oliveira, 2009; FDA, 2014).	11
Quadro 2.6-Temperatura em graus Celcius, mínima, ótima e máxima, para alguns microrganismos (adaptado de FDA, 2014).	11
Quadro 2.7-Microrganismos frequentemente encontrados em carnes frescas (adaptado de Jay et al., 2005).	15
Quadro 2.8-Algumas bactérias patogênicas associadas às carnes de vaca e de porco (adaptado de Heredia & Wesley 2009)	16
Quadro 2.9-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de Salmonella (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014)	17
Quadro 2.10-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de Staphylococcus aureus (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014).	18
Quadro 2.11-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de Listeria monocytogenes (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014).	19
Quadro 2.12-Sintomas associados à infecção por Escherichia coli (adaptado de Jay et al., 2005; Lawley et al., 2008).	20
Quadro 2.13-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de Escherichia coli (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014).	20
Quadro 2.14-Ferramentas auxiliares da Microbiologia Preditiva disponíveis online e as respectivas entidades oficiais criadoras (adaptado de Rodríguez & Valero, 2013).	22
Quadro 4.1-Limites dos parâmetros físico-químicos para os diversos microrganismos no PMP (adaptado de ARS.USDA, 2014).	46
Quadro 4.2-Limites dos parâmetros físico-químicos para os diversos microrganismos no ComBase (adaptado de ComBase, 2014).	47
Quadro 5.1-Microrganismos aeróbios totais a 30°C (UFC/g) para as amostras de carne de vaca.	49
Quadro 5.2-Microrganismos aeróbios totais a 30°C (UFC/g) para as amostras de carne de porco.	50
Quadro 5.3-Amostras de carne de vaca com resultados positivos para <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Salmonella</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	50
Quadro 5.4-Amostras de carne de porco com resultados positivos para <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Salmonella</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	51
Quadro 5.5-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.1 conservada a 5°C (A5.1) e a 10°C (A10.1).	54
Quadro 5.6-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra A10.1, durante 144 horas.	54

Quadro 5.7-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.11 conservada a 5°C (A5.11) e a 10°C (A10.11).....	56
Quadro 5.8-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra A10.11, durante 144 horas.....	56
Quadro 5.9-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.12 conservada a 5°C (A5.12) e a 10°C (A10.12).....	57
Quadro 5.10-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>S. aureus</i> , na amostra A10.12, durante 144 horas.....	58
Quadro 5.11-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>S. aureus</i> , com e sem fase Lag, na amostra A10.12, durante 144 horas.....	59
Quadro 5.12-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.13 conservada a 5°C (A5.13) e a 10°C (A10.13).....	60
Quadro 5.13-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.13, durante 144 horas.....	60
Quadro 5.14-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>S. aureus</i> , na amostra A10.13, durante 144 horas.....	61
Quadro 5.15-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>S. aureus</i> , com e sem fase Lag, na amostra A10.13, durante 144 horas.....	62
Quadro 5.16-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.15 conservada a 5°C (A5.15) e a 10°C (A10.15).....	63
Quadro 5.17-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.15, durante 144 horas.....	64
Quadro 5.18-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.16 conservada a 5°C (A5.16) e a 10°C (A10.16).....	65
Quadro 5.19-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra A10.16, durante 144 horas.....	65
Quadro 5.20-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B3 conservada a 5°C (B5.3) e a 10°C (B10.3). ....	67
Quadro 5.21-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.3, durante 144 horas.....	67
Quadro 5.22-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B4 conservada a 5°C (B5.4) e a 10°C (B10.4). ....	69
Quadro 5.23-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra B10.4, durante 144 horas.....	69
Quadro 5.24-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B6 conservada a 5°C (B5.6) e a 10°C (B10.6). ....	71
Quadro 5.25-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E. coli</i> , na amostra B10.6, durante 144 horas.....	71
Quadro 5.26-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B7 conservada a 5°C (B5.7) e a 10°C (B10.7). ....	72
Quadro 5.27-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.7, durante 144 horas,.....	72
Quadro 5.28-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B8 conservada a 5°C (B5.8) e a 10°C (B10.8). ....	73
Quadro 5.29-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B5.8 e B10.8, durante 144 horas.....	74
Quadro 5.30-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B5.8 e B10.8, durante 144 horas.....	75

Quadro 5.31-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B10 conservada a 5°C (B5.10) e a 10°C (B10.10).....	76
Quadro 5.32-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.10, durante 144 horas.....	76
Quadro 5.33-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , nas amostras B5.10 e B10.10, durante 144 horas. ....	77
Quadro 5.34-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B5.10 e B10.10, durante 144 horas. ....	78
Quadro 5.35-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B13 conservada a 5°C (B5.13) e a 10°C (B10.13).....	79
Quadro 5.36-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.13, durante 144 horas. ....	80
Quadro 5.37-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B10.13, durante 144 horas. ....	81
Quadro 5.38-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B15 conservada a 5°C (B5.15) e a 10°C (B10.15).....	82
Quadro 5.39-Previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.15, durante 144 horas.....	82
Quadro 5.40-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B16 conservada a 5°C (B5.16) e a 10°C (B10.16).....	83
Quadro 5.41-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.16, durante 144 horas.....	83
Quadro 5.42-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B18 conservada a 5°C (B5.18) e a 10°C (B10.18).....	84
Quadro 5.43-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B5.18 e B.10.18, durante 144 horas. ....	85
Quadro 5.44-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B5.18 e B10.18, durante 144 horas. ....	86
Quadro 5.45-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B19 conservada a 5°C (B5.19) e a 10°C (B10.19).....	87
Quadro 5.46-Resultados, da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.19, durante 144 horas.....	87
Quadro 5.47-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.19, durante 144 horas. ....	88
Quadro 5.48-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B10.19, durante 144 horas. ....	89
Quadro 5.49-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B20 conservada a 5°C (B5.20) e a 10°C (B10.20).....	90
Quadro 5.50-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>E.coli</i> , na amostra B10.20, durante 144 horas.....	90
Quadro 5.51-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , na amostra B10.20, durante 144 horas. ....	91
Quadro 5.52-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de <i>L.monocytogenes</i> , com e sem fase Lag, na amostra B10.20, durante 144 horas. ....	92
Quadro 5.53 Valores de pH, NaCl e previsão de UFC/g de acordo com o modelo ComBase para as amostras conservadas a 10°C que tiveram contagens positivas.....	93
Tabela 5.54-Resultados reais e do ComBase para as amostras de carne de Vaca, com contagens positivas de <i>E.coli</i> .....	93

Tabela 5.55-Resultados reais do ComBase e do PMP para as amostras de carne de Vaca, com contagens positivas de <i>S.aureus</i> .....	94
Tabela 5.56-Resultados reais e do ComBase para as amostras de carne de Porco, com contagens positivas de <i>E.coli</i> .....	94
Tabela 5.57-Resultados reais do ComBase e do PMP para as amostras de carne de Porco, com contagens positivas de <i>L.monocytogenes</i> .....	95
Quadro 5.58-Valor do quociente entre o número de ufc/g previsto, pelo modelo ComBase e o número de UFC/g determinado pelas análises laboratoriais.....	96
Quadro 8.1-Resultados de aw, pH, NaCl (%), para as amostras de carne de vaca. ....	105
Quadro 8.2-Resultados de aw, pH, NaCl (%) para as amostras de carne de porco ....	106
Quadro 8.3-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T0 (NA-nº amostra; *- <i>Salmonella</i> negativa em 10g) .....	107
Quadro 8.4-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T2, a 5°C (NA-nº amostra).....	108
Quadro 8.5-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T2, a 10°C (NA-nº amostra).....	109
Quadro 8.6-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T4, a 5°C (NA-nº amostra).....	110
Quadro 8.7-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T4, a 10°C (NA-nº amostra).....	111
Quadro 8.8-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T6, a 5°C (NA-nº amostra).....	112
Quadro 8.9-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de vaca, no T6, a 10°C (NA-nº amostra).....	113
Quadro 8.10-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T0 (NA-nº amostra; *- <i>Salmonella</i> negativa em 10g). ....	114
Quadro 8.11-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T2, a 5°C (NA-nº amostra). ....	115
Quadro 8.12- Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T2, a 10°C (NA-nº amostra) .....	116
Quadro 8.13-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T4, a 5°C (NA-nº amostra). ....	117
Quadro 8.14-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T4, a 10°C (NA-nº amostra). ....	118

Quadro 8.15-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T6, a 5°C (NA-nº amostra). ....	119
Quadro 8.16-Resultados, em UFC/g, da contagem de <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , microrganismos totais a 30°C e pesquisa de <i>Salmonella</i> , em 20 amostras de carne de porco, no T6, a 10°C (NA-nº amostra). ....	120





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>a<sub>w</sub></b>	Atividade da água
<b>AL</b>	Agar Listeria
<b>BPM</b>	Baird Parker Medium
<b>BPW</b>	Buffered Peptone Water/ Água PeptonadaTamponada
<b>DTU Aqua</b>	DTU National Institute of Aquatic Research
<b>Eh</b>	Potencial de oxidação-redução
<b>EHEC</b>	Enterohemorrhagic <i>E.coli</i> / <i>E.coli</i> Enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	Enteroinvasive <i>E.coli</i> / <i>E.coli</i> Enteroinvasiva
<b>EPEC</b>	Enteropathogenic <i>E.coli</i> / <i>E.coli</i> Enteropatogénica
<b>ERRC</b>	Eastern Regional Research Center
<b>ETEC</b>	Enterotoxigenic <i>E.coli</i> / <i>E.coli</i> Enterotoxinogénica
<b>FSC</b>	Food Safety Center in Australia
<b>h</b>	Horas
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points/Análise de Perigos e Pontos de Controlo Crítico
<b>HR</b>	Humidade Relativa
<b>IFR</b>	Institute of Food Research
<b>INRA</b>	French National Institute of Agricultural Research
<b>Lag</b>	Fase de latência
<b>p</b>	Pressão de vapor de água no alimento
<b>p<sub>0</sub></b>	Pressão de vapor de água pura
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>PCC</b>	Ponto de Controlo Crítico
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniónico
<b>PI-PLC</b>	Atividade da enzima fosfatidilinositol fosfolipase C
<b>PMP</b>	Pathogen Modeling Program
<b>RLM</b>	Rapid L'Mono
<b>RPF</b>	Rabbit Plasma Fibrinogen/ Plasma Fibrinogénio de coelho
<b>RVS</b>	Rappaport Vassiliadis
<b>TBX</b>	Tryptone-bile X-glucuronic/ triptona-bílis X-glucorónico
<b>UCO</b>	University of Córdoba
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colónias
<b>USDA-ARS</b>	U.S Department of Agriculture-Agricultural Research Center
<b>WISC</b>	The University of Wisconsin Center for Meat



# 1. OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

## 1.1 Enquadramento

A microbiologia preditiva reúne conhecimentos derivados de diversas disciplinas, como, a matemática, a estatística, os sistemas de informação e tecnologia e a microbiologia clássica. Esta interligação de conhecimentos pretende a construção de modelos que prevejam o comportamento microbiano em matrizes alimentares, objetivando a prevenção da deterioração dos alimentos e de doenças de origem alimentar.

Os modelos preditivos têm como principal objectivo prever as alterações do comportamento microbiano, nos alimentos, a partir do conhecimento das propriedades do próprio alimento e das suas condições de armazenamento. Dentro destas propriedades e condições de armazenamento encontram-se a actividade da água ( $a_w$ ), o pH, a concentração em cloreto de sódio, a temperatura, a humidade relativa e a composição da atmosfera, por serem parâmetros que determinam o comportamento microbiano.

O primeiro modelo preditivo é datado no século XX e hoje em dia, graças à evolução que microbiologia preditiva teve desde então, existem diversos modelos que podem dividir-se em modelos preditivos primários, secundários e terciários. Estes modelos são aplicados, com o objetivo, de melhorar a qualidade e segurança alimentar, podendo ser utilizados como ferramentas auxiliares na área da Análise de Perigos e Pontos de Controlo Crítico (HACCP).

Devido à complexidade do comportamento microbiano em ambientes alimentares, os modelos preditivos, possuem limitações, podendo, as estimativas que efectuam, desviar-se das situações reais. Desta forma, os modelos terciários, não são ainda completamente fiáveis, mas necessitam ser alvo de um desenvolvimento e melhoria contínua, de forma a que no futuro sejam ferramentas fiáveis auxiliadoras na área da qualidade e segurança alimentar, possuindo maior aplicabilidade a situações práticas e reais.

Este trabalho objetiva avaliar a aplicabilidade da microbiologia preditiva, nomeadamente dos seus modelos terciários (*softwares* preditivos) e especificamente o ComBase Predictor e Pathogen Modeling Program (PMP), em amostras de carne de vaca e porco armazenadas a 5°C e 10°C, avaliando a aproximação das previsões obtidas através dos dois *softwares*, com os resultados obtidos através das análises microbiológicas tradicionais efectuadas em laboratório.

## **1.2 Estrutura**

Neste capítulo 1, é realizada a estruturação e enquadramento lógico desta dissertação. No capítulo 2, é efetuada toda a revisão bibliográfica considerada relevante à percepção deste trabalho. Assim, no capítulo 2 é apresentado um breve esclarecimento acerca da história da Microbiologia Preditiva, prosseguindo com temas relevantes como, as variadas aplicações desta ciência, fatores que afetam o desenvolvimento microbiano, tipos de microrganismos relevantes a esta pesquisa e as suas respectivas características. Para finalizar, abordam-se os modelos, as limitações, os desafios e as perspectivas futuras relativas à Microbiologia Preditiva.

No capítulo 3, é caracterizada a empresa SGS (Sociedade Geral de Superintendência), onde se realizou este trabalho. No capítulo 4, é relatado o desenvolvimento experimental completo desta investigação, obtenção de amostras, preparação de meios de cultura e métodos horizontais de detecção ou enumeração dos microrganismos, com indicação de todos os equipamentos, materiais e reagentes utilizados. No capítulo 5 são expostos os resultados obtidos da análise microbiológica em laboratório das amostras de carne de vaca e de porco e das previsões das ferramentas da Microbiologia Preditiva, nomeadamente, ComBase Predictor e PMP (Pathogen Modeling Program). Por último, no capítulo 6, são apresentadas as conclusões fundamentais deste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 História da microbiologia preditiva

A origem da microbiologia preditiva é frequentemente ligada aos trabalhos realizados por Bigelow, Esty e Meyer, na década de 20, na qual foi proposto um modelo matemático log-linear para descrever a cinética da morte bacteriana através do calor. Este modelo encontrou uma ampla aplicação na indústria alimentar, especialmente na indústria de enlatados (Rodríguez & Valero, 2013). Durante os anos 60 e 70, foram realizados vários esforços de forma a aplicar os modelos matemáticos à inativação de microrganismos patogênicos e ao crescimento de bactérias deterioradoras (Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

O termo microbiologia preditiva, que é relativamente recente, foi criado por Robert e Jarvis em 1983, que estabeleceram as bases conceituais desta microbiologia, no entanto, alguns anos antes, Scott já tinha apresentado ideias semelhantes, mas para um caso específico, salientando a importância das taxas de crescimento a diferentes temperaturas, de forma a prever alterações nas populações microbianas em carne de vaca (Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

Durante os anos 80, deu-se o início do grande desenvolvimento desta ciência, devido, à evolução dos computadores e *softwares* específicos, que facilitaram a resolução e desenvolvimento de equações matemáticas complexas e, portanto, auxiliaram na evolução de modelos preditivos mais precisos. Um outro fator que contribuiu para o avanço da microbiologia preditiva foi a crescente preocupação com a saúde pública, devido a um aumento do número de intoxicações alimentares que ocorreram nesta década e a consciencialização de que os métodos praticados, na altura, para analisar microrganismos, eram fortemente condicionados pelo tempo de obtenção dos resultados. Desta forma, a década de oitenta foi marcada por avanços importantes na criação de modelos, propondo-se diferentes funções matemáticas de forma a prever a relação entre a temperatura, outros fatores ambientais e parâmetros cinéticos. O desenvolvimento dos modelos nesta época permitiu criar uma nova família de modelos. Embora alguns estudos efetuados na época fornecessem uma visão sobre os princípios matemáticos subjacentes à dependência dos parâmetros cinéticos sobre os fatores ambientais, outros estudos dedicavam-se ao desenvolvimento de funções matemáticas adequadas, que permitissem refletir o padrão de crescimento, descrito por bactérias, em alimentos (Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

A microbiologia preditiva, desde o seu início, tem sido profundamente analisada e investigada, com o principal propósito de melhorar a qualidade e a segurança alimentar, é visível a sua evolução até aos dias de hoje e é calculável o seu desenvolvimento no futuro. Durante os últimos anos, esta ciência tem-se movido também para outras áreas de pesquisa, tais como, o estudo de modelos baseados em células individuais e modelagem à base do genoma, com o objetivo de explorar de forma aprofundada os fatores que governam o comportamento microbiano (Duarte, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

Atualmente a microbiologia preditiva está presente como uma ferramenta auxiliar, principalmente na indústria alimentar, sendo aplicada, por exemplo, na avaliação de riscos, na determinação dos prazos de validade ou na implementação de planos de HACCP (Anastácio, 2009; Duarte, 2011; Rodríguez & Valero, 2013)

## 2.2 Microbiologia Preditiva

A Microbiologia preditiva pode ser encarada como uma integração de conhecimentos da microbiologia clássica com sabedorias provindas de outras disciplinas, nomeadamente da matemática, da estatística e dos sistemas de informação e tecnologia, com o objetivo de descrever o comportamento microbiano a diversos fatores ambientais. Esta junção de conhecimentos pretende construir modelos matemáticos que descrevam o comportamento dos microrganismos em alimentos (Miller *et al.*, 2004), objetivando prever e prevenir a contaminação e deterioração dos alimentos, por parte dos microrganismos e desta forma, evitar doenças de origem alimentar. Como modelo matemático, entende-se a descrição de um sistema real, utilizando equações matemáticas, que são simplificações do mesmo, baseadas nas suas propriedades mais significativas (Rodríguez & Valero, 2013). Esta microbiologia pode então, ser considerada um ramo científico da microbiologia alimentar, que tem por objetivo avaliar o comportamento microbiano em ambientes alimentares, de forma a obter modelos matemáticos adequados (Fakruddin *et al.*, 2011).

A microbiologia preditiva pressupõe que o ambiente é o fator determinante no comportamento microbiano, uma vez que as respostas de um microrganismo específico a um determinado ambiente podem ser quantificadas, sendo assim possível definir o seu comportamento em condições semelhantes. Esta área da microbiologia utiliza basicamente modelos de previsão que envolvem o estudo de um microrganismo em particular num determinado alimento, em ambiente conhecido e controlado (Anastácio, 2009). O comportamento das populações microbianas em alimentos, é definido por características do próprio microrganismo e por características intrínsecas aos próprios alimentos, como, por exemplo, o seu pH ou a sua actividade da água ( $a_w$ ) e também pelo ambiente que envolve o alimento, por outras palavras, por fatores extrínsecos, como, por exemplo a temperatura ou a atmosfera envolvente. A avaliação do comportamento microbiano subentende o desenvolvimento dos microrganismos presentes, bem como a velocidade a que se processa esse desenvolvimento numa determinada matriz alimentar, sendo que essa velocidade é tanto maior quanto melhor forem as condições para o desenvolvimento de um dado microrganismo. Posto isto, quanto maior a velocidade de crescimento microbiano num determinado alimento, maiores são as alterações que ocorrem nesse mesmo alimento (FDA, 2014)

Hoje em dia, existem vários modelos preditivos disponíveis, para utilização do público, no capítulo 2.7, este tema será aprofundado.

### **2.2.1 Aplicações da microbiologia preditiva**

A microbiologia preditiva é uma ferramenta que parece ter bastante utilidade. Algumas das suas áreas e respetivas formas de aplicação, encontram-se referidas no quadro 2.1.

**Quadro 2.1**-Aplicações da microbiologia preditiva (adaptado de Fakruddin et al., 2011).

<b>ÁREA DE APLICAÇÃO</b>	<b>EXEMPLO DE APLICAÇÃO</b>
HACCP	<ul style="list-style-type: none"><li>- Análise preliminar dos riscos</li><li>- Identificação e estabelecimento do (s) ponto (s) de Controlo Crítico</li><li>- Determinação de ações corretivas</li><li>- Avaliação da importância da interação entre as variáveis</li></ul>
Avaliação de Riscos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Estimativas de alteração do nível de contaminação na cadeia de produção</li></ul>
Estudos do tempo de vida útil do produto	<ul style="list-style-type: none"><li>- Previsão do crescimento de microrganismos específicos deterioradores de alimentos</li><li>- Previsão do crescimento de microrganismos patogénicos específicos em alimentos</li></ul>
Pesquisa e desenvolvimento de novos produtos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Efeitos da alteração da composição do produto na sua segurança e deterioração</li><li>- Efeitos do processamento na segurança alimentar e deterioração</li></ul>
Funções da integração da temperatura e regulação da atividade de higiene	<ul style="list-style-type: none"><li>- Consequência da temperatura na cadeia de frio para segurança e deterioração</li></ul>

### **2.2.2. Microbiologia preditiva e HACCP**

O HACCP é um sistema que permite identificar e prevenir potenciais problemas de segurança alimentar relativos à produção, manuseamento, distribuição e utilização de um género alimentar. Este sistema, intenta identificar perigos microbiológicos, químicos e físicos que possam afetar os alimentos, estudar as suas rotas de entrada nos alimentos (matérias-primas, etapas de produção, etc.), os métodos para prevenir esta entrada e para eliminar os potenciais problemas com os produtos acabados (Baptista *et al.*, 2003). A aplicação da microbiologia preditiva no sistema de HACCP, possui um grande potencial, pois os modelos preditivos podem ser utilizados como ferramentas auxiliares de decisões relevantes, tais como, o estabelecimento de limites críticos e a identificação de géneros alimentícios que se desviem dos limites críticos estabelecidos. Um ponto de controlo crítico pode existir onde o modelo preditivo indicar que um determinado nível de um certo fator ambiental permita ou seja o ideal para o crescimento microbiano. O potencial que a

microbiologia preditiva possui, como ferramenta auxiliar às decisões e na otimização de processos, é um tema de pesquisa extensiva por todo o mundo (Baptista *et al.*, 2003; Fakruddin *et al.*, 2011; Duarte, 2011).

Uma comparação, resumida, entre a microbiologia preditiva e o sistema de Análise de Perigos e Pontos de Controlo Crítico, encontra-se no quadro 2.2.

**Quadro 2.2-** Comparação entre Microbiologia Preditiva e HACCP (adaptado de Fakruddin *et al.*, 2011).

<b>MICROBIOLOGIA PREDITIVA</b>	<b>HACCP</b>
Identificar o(s) microrganismo(s) de interesse	Identificar potenciais perigos e severidades em diferentes fases de processamento e operações
Expandir a compreensão acerca da ecologia do microrganismo de interesse, para melhor identificar a origem e probabilidade de contaminação	Identificar os Pontos de Controlo Crítico (PCC), onde é necessário um controlo muito apertado das medidas preventivas implementadas
Comparar informações com especificações de controlo predefinidas	Especificar critérios de controlo e métodos que assegurem o alcance do controlo

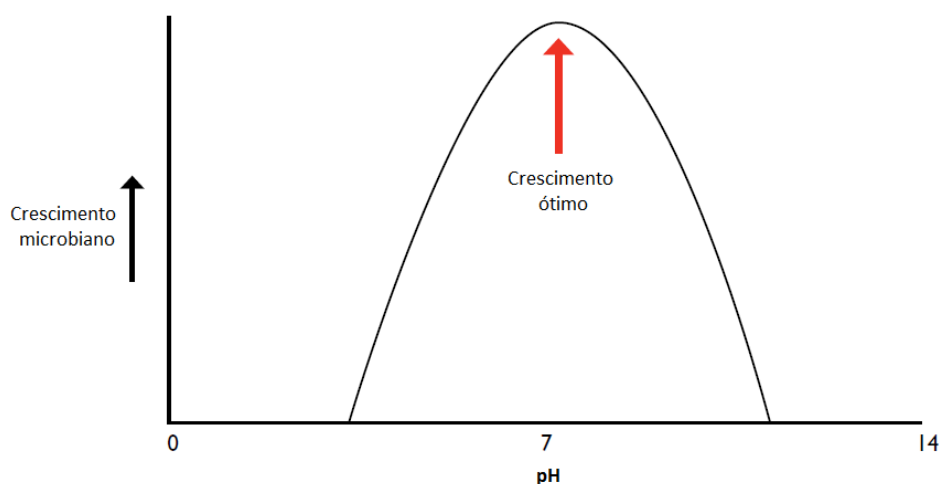
## 2.3 Fatores intrínsecos e extrínsecos

A flora microbiana existente num dado alimento, num dado momento, resulta de interações complexas e contínuas entre determinados fatores, os microrganismos e a matriz (FDA, 2014). Esses fatores, que afetam o desenvolvimento microbiano, podem dividir-se em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros estão relacionados com os próprios alimentos, ou seja, o pH, a atividade da água ( $a_w$ ), o potencial de oxidação-redução (Eh), os nutrientes disponíveis, os agentes antimicrobianos, as estruturas biológicas e a flora microbiana; os fatores extrínsecos são essencialmente as características do ambiente envolvente e de armazenamento, incluem a temperatura, a presença e concentração de gases, como o CO<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub>, a humidade relativa e o manuseamento. (Novais, 1998, Pampulha, 1998).

### 2.3.1 Fatores intrínsecos

O pH é uma medida de acidez. Assim, quanto maior for o teor de substâncias ácidas presentes num alimento, menor será o seu pH e logo mais ácida é essa matriz. O pH afeta não só o desenvolvimento dos microrganismos, como também influencia a sua taxa de sobrevivência durante o armazenamento e conservação do produto. Com o conhecimento do valor de pH, é possível estimar quais os tipos de microrganismos possivelmente presentes num determinado género alimentício, uma vez que cada microrganismo possui uma determinada gama de pH onde consegue crescer (figura 2.1).





**Figura 2.1**-Exemplo de uma curva de crescimento microbiano em função da variação do pH (adaptado de Oliveira, 2009).

A maior parte dos microrganismos multiplica-se melhor a valores de pH próximos de 7, ou seja, a pH neutro, sendo poucos os que se desenvolvem abaixo de 2 e acima de 10, mas cada microrganismo possui um valor de pH ótimo para o seu desenvolvimento, como tal, é possível efetuar a sua classificação em microrganismos acidófilos, que crescem em valores baixos (1,0 a 5,5), os alcalófilos que se multiplicam em valores elevados (8,5 a 11,5) e por último os neutrófilos que preferem valores de pH entre 5,5 e 8,0 (FDA, 2014).

Em géneros alimentares com um pH baixo, como por exemplo o vinagre e alguns frutos, a contaminação é principalmente efetuada por uma flora fúngica, visto que, a maioria das bactérias, dificilmente consegue multiplicar-se em meios muito ácidos (quadro 2.3). Em outros alimentos, tais como, a carne e o peixe, em que os valores de pH se aproximam de 5,6, as bactérias são as principais responsáveis pela contaminação (Oliveira, 2009).

**Quadro 2.3**-Valores mínimos de pH necessários para o desenvolvimento de alguns microrganismos (adaptado de Jay, 2000; Oliveira 2009)

MICROORGANISMOS	VALOR DE pH MÍNIMO
<i>Salmonella spp</i>	3,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,3
<i>Escherichia coli</i>	4,0
<i>Botrytis cinerea</i>	2,0
<i>Penicillium roqueforti</i>	3,0

Para todas as populações microbianas, a água possui um papel crucial, pois é um componente básico da célula e é também o meio onde ocorrem as reações celulares. A atividade da água ( $a_w$ ) é definida como a razão entre a pressão do vapor de água no alimento ( $p$ ) e a pressão de vapor da água pura ( $p_0$ ), à mesma temperatura ( $a_w=p/p_0$ ), os seus valores apresentam-se entre 0 e 1 (Oliveira, 2009; FDA, 2014).

As diferentes capacidades de adaptação, aos valores de  $a_w$ , por parte dos microrganismos, definem a sua capacidade de evolução nos alimentos. Alguns são capazes de crescer numa extensa gama de valores de  $a_w$ , mas a maioria prefere ou apenas consegue crescer, em valores próximos ou superiores a 0,98 (FDA, 2014). Assim, as matrizes com maior teor de  $a_w$ , como é o caso dos alimentos frescos, cujos valores de  $a_w$  podem ser próximos de 0,99, são muito susceptíveis a deterioração microbiana (Oliveira, 2009).

A diminuição do  $a_w$  tem como consequência a aceleração da fase de latência (lag) e a diminuição da taxa de crescimento (FDA, 2014).

As bactérias halófilas, que crescem em presença de elevadas concentrações de sal, podem crescer em alimentos com  $a_w$  de 0,75; já os fungos xerófilos, são capazes de crescer em alimentos muito secos em que o  $a_w$  ronda os 0,65 e organismos osmófilos, que preferem crescer em presença de elevadas concentrações de solutos orgânicos, toleram valores próximos 0,61 (Jay *et al.*, 2005). Em termos de exigências dos microrganismos, as bactérias exigem valores de  $a_w$  superiores aos dos fungos e as bactérias Gram-positivas toleram valores inferiores aos das Gram-negativas (quadro 2.4) (Oliveira, 2009).

**Quadro 2.4**-Valores de  $a_w$  para o crescimento de alguns microrganismos patogénicos em alimentos (adaptado de FDA, 2014).

MICROORGANISMOS	MÍNIMO	ÓTIMO	MÁXIMO
<i>Salmonella spp.</i>	0,94	0,99	>0,99
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,83	0,98	0,99
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92	-	-
<i>Escherichia coli</i>	0,95	-	-

Os nutrientes disponíveis na matriz, determinam, em grande parte, o tipo de microrganismos capazes de se desenvolver na mesma, pois estes possuem necessidades diferentes a nível de macro e micronutrientes, necessitando, para além da água, de uma fonte de azoto, de energia, de vitaminas e de minerais (FDA, 2014).

A fonte de energia vem principalmente de glúcidos, álcoois e aminoácidos existentes na matriz. Alguns microrganismos metabolizam açúcares simples, outros açúcares mais complexos e

ainda outros possuem a aptidão para metabolizar a gordura. Os aminoácidos servem também como fonte de azoto, bem como a ureia, a amónia e metilaminas. Alguns dos minerais essenciais, em pequenas quantidades, para o crescimento microbiano, são o fósforo, o ferro, o magnésio, o manganês, o cálcio e o potássio (FDA, 2014).

Os alimentos permitem o crescimento de microrganismos, mas também possuem formas de os evitar, especialmente no seu estado cru. Desta forma, os alimentos possuem estruturas biológicas que funcionam como barreiras físicas que podem prevenir a entrada de microrganismos e o seu desenvolvimento. Alguns exemplos destas barreiras físicas incluem a casca dos frutos e vegetais e a cutícula do ovo. Para além das barreiras físicas, os alimentos podem, igualmente, possuir defesas químicas contra os microrganismos. Exemplo disso é a lizosima, enzima existente na clara do ovo capaz de provocar a lise das paredes celulares de bactérias Gram-positivas. Exemplos de outros agentes antimicrobianos, naturalmente presentes nos alimentos ou adicionados propositadamente para aumentar a sua conservação, incluem o cloreto de sódio, os ácidos orgânicos e a nisina, entre outros. Estas substâncias contribuem positivamente para a inibição do crescimento de microrganismos, no entanto, o nível em que normalmente se encontram no alimento, é demasiado baixo para que consigam ser eficazes por si mesmas, devendo ser combinadas com outros fatores, tais como, o pH ou a atividade da água de forma a assegurar a estabilidade do género alimentício (Novais, 1998; Pampulha, 1998 FDA, 2014).

O potencial de oxidação redução, ou redox, é definido como o rácio entre a energia oxidante total e a energia redutora total da matriz, é basicamente uma forma de medir a capacidade, que uma dada substancia possui, para ganhar ou perder eletrões, apresentando os seus resultados em milivolts. Este fator intrínseco é dependente do pH e pode ainda ser afetado pela presença de sal e outros constituintes da matriz (FDA, 2014).

Determinados grupos de microrganismos, baseiam a sua multiplicação numa relação com o potencial redox, sendo estes, os aeróbios, com valores de Eh entre +500 a +300 mV, os anaeróbios, entre +100 a -250 mV, os aeróbios facultativos entre +300 a -100 mV e os microaerófilos com valores intermédios que beneficiam de condições em que haja uma redução ligeira do Eh (Kilcast & Subramaniam, 2000; FDA, 2014).

A flora microbiana de um alimento depende das características do mesmo, bem como das interações entre os microrganismos presentes. Existem atributos biológicos individuais dos próprios microrganismos, que podem definir qual a espécie que se tornará predominante na matriz, sendo estes, a taxa de crescimento individual das populações microbianas e as interações mútuas ou influências entre espécies (FDA, 2014).

Enquanto os organismos permanecem metabolicamente ativos, continuam a interagir, de modo a que o domínio da flora ocorre como um processo dinâmico. Estas interações podem ser antagónicas ou sinérgicas. As interações sinérgicas devem-se principalmente à capacidade, de determinados microrganismos, para reutilizarem os produtos metabólicos de outros organismos, criando uma associação com os mesmos. Geralmente os processos antagónicos incluem a competição por nutrientes, por espaços de adesão ou alterações desfavoráveis no meio. Os

organismos com elevada atividade metabólica, podem consumir nutrientes necessários, reduzindo seletivamente estas substâncias, inibindo o crescimento de outros organismos concorrentes, também a acumulação de produtos metabólicos pode limitar o crescimento de determinadas espécies (FDA, 2014).

### **2.3.2 Fatores extrínsecos**

Estes parâmetros estão principalmente associados ao ambiente de armazenamento e às características do ambiente envolvente, incluindo a temperatura, a presença e concentração de gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etc.), a humidade relativa e o manuseamento. (Novais, 1998, Pampulha, 1998).

A temperatura é um fator que afeta em muito o desenvolvimento microbiano, todos os microrganismos possuem uma extensão de temperatura, na qual se multiplicam, ou seja, um valor limite mínimo, ótimo e máximo. Este fator possui um impacto dramático no desenvolvimento microbiano e na velocidade da sua multiplicação. Quando as temperaturas se aproximam do limite máximo de um determinado microrganismo, a taxa de crescimento decresce mais rapidamente do que quando se aproximam do limite mínimo. A temperaturas baixas, existem dois parâmetros que determinam o ponto em que o crescimento microbiano cessa, sendo estes, a taxa de reação enzimática no organismo, que diminui com a diminuição da temperatura, e a fluidez da membrana citoplasmática que também se reduz com a diminuição da temperatura, interferindo com os mecanismos de transporte. A temperaturas elevadas, a estrutura dos componentes celulares começa a desnaturar e realiza-se a inativação das enzimas termosensíveis. Assim, a taxa de crescimento começa por aumentar em simultâneo com o aumento da temperatura até se atingir o máximo de velocidade de crescimento. Em seguida, esta taxa tende a sofrer um decréscimo rápido como resultado do aumento excessivo da temperatura.

A relação entre a temperatura e o crescimento microbiano varia significativamente dentro dos grupos de microrganismos, podendo estes ser, então, classificados em psicrófilos, psicotróficos, mesófilos e termófilos (quadro 2.5) (Novais, 1998; Kilcast & Subramaniam, 2000; FDA, 2014). A temperatura ótima de crescimento do grupo de termófilos situa-se entre os 55 e os 65°C, sendo a máxima de 90°C e a mínima de 40°C. Os mesófilos possuem um limite ótimo de crescimento entre 30 e 45°C e um intervalo mínimo de 5°C a 10°C, com um valor máximo de 45°C. Os organismos psicrófilos têm um intervalo ótimo de desenvolvimento entre os 12°C e os 15°C, com uma capacidade de temperatura máxima de 15 a 20°C. Por último, o grupo dos psicotróficos são capazes de se desenvolver a temperaturas mínimas de 0 e 5°C, mas possuem uma temperatura máxima de 30 a 37°C, sendo que a sua temperatura ótima se situa entre os 20 e os 30°C. Estes últimos microrganismos são muito relevantes em termos alimentares, pois incluem bactérias e leveduras deterioradoras bem como fungos e alguns organismos patogénicos como é o exemplo da *Listeria monocytogenes* (FDA, 2014).

**Quadro 2.5-**Classificação dos microrganismos consoante as exigências de temperatura (adaptado de Oliveira, 2009; FDA, 2014).

TEMPERATURA (°C)	PSICRÓFILOS	PSICOTRÓFICOS	MESÓFILOS	TERMÓFILOS
Máxima	15 a 20	30 a 37	45	90
Ótima	12 a 15	20 a 30	30 a 45	55 a 65
Mínima	<0 a 5	<0 a 5	5 a 10	40

Alguns microrganismos patogénicos de origem alimentar e as suas respetivas temperaturas mínimas, ótimas e máximas, encontram-se referidos no quadro 2.6.

**Quadro 2.6-**Temperatura em graus Celcius, mínima, ótima e máxima, para alguns microrganismos (adaptado de FDA,2014).

MICROORGANISMO	MÍNIMA	ÓTIMA	MÁXIMA
<i>Salmonella</i> spp.	5	35 a 37	45 a 47
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	35 a 40	48
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30 a 37	45
<i>Escherichia coli</i>	7	35 a 40	46

Ainda que as temperaturas sejam relativamente baixas, ou seja, temperaturas de refrigeração, se a humidade for elevada o desenvolvimento de microrganismos pode ocorrer de forma rápida. Da mesma forma, os alimentos secos, quando acondicionados em ambientes com humidade significativa encontram-se mais suscetíveis à deterioração microbiológica. A sensibilidade dos microrganismos à temperatura faz com que a manipulação deste fator seja utilizada como forma de aumentar o tempo de vida de prateleira e logo a qualidade dos produtos alimentares (Kilcast & Subramaniam, 2000; D'Amico *et al.*, 2006; Oliveira, 2009).

A atmosfera gasosa também tem influência sobre a proliferação dos microrganismos. Assim, atmosferas ricas em gases como o dióxido de carbono, o ozono ou o oxigénio podem condicionar o desenvolvimento microbiano por diversos mecanismos. Um desses mecanismos consiste nos gases terem um efeito tóxico direto para determinados microrganismos. Por exemplo, os radicais provenientes do oxigénio e do ozono são altamente tóxicos para as bactérias anaeróbias, que não possuem defesas enzimáticas para lidar com este tipo de espécies reactivas, podendo, dependendo da sua concentração, inibir igualmente as bactérias aeróbias. O dióxido de carbono é efetivamente um gás inibidor para os microrganismos aeróbios estritos e, em concentrações elevadas, pode afetar igualmente outros microrganismos (Novais, 1998; FDA, 2014).

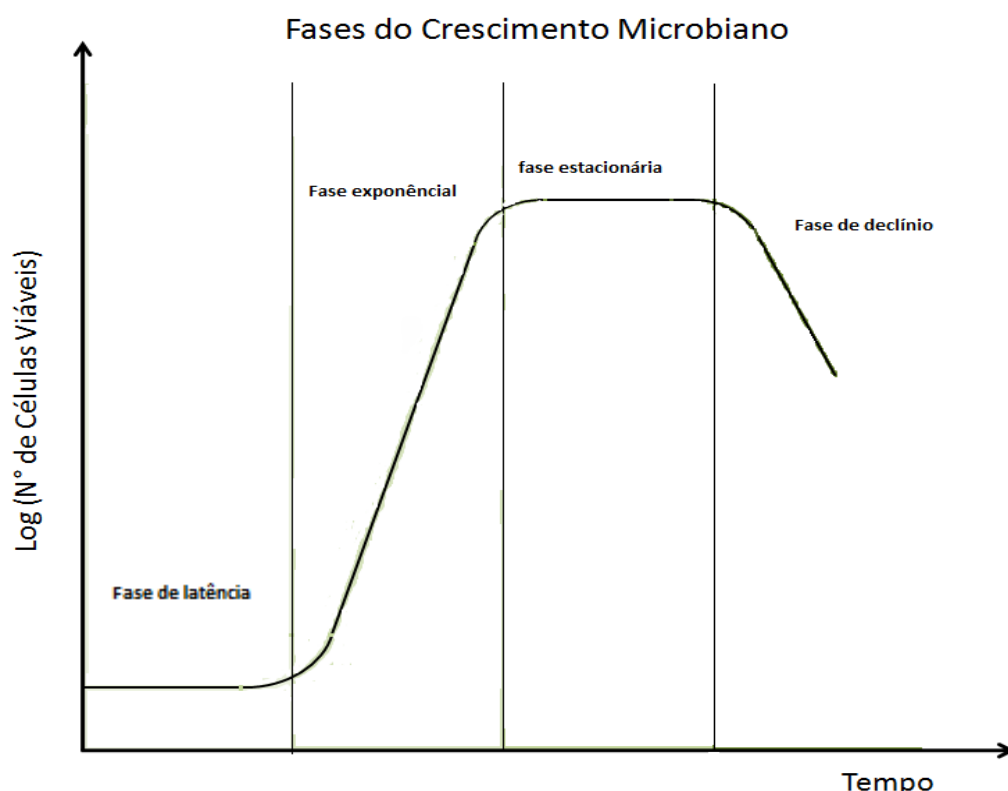
Hoje em dia, em prol do aumento do tempo de vida de prateleira dos produtos, existem diversas tecnologias que passam pela utilização de gases, na atmosfera envolvente do alimento, de forma a controlar a sua estabilidade, segurança e qualidade. Contudo, quando existe alteração na atmosfera envolvente da matriz, a microflora competitiva também se modifica. Assim, as atmosferas que têm um efeito negativo no crescimento de um determinado microrganismo, podem ter um efeito positivo no crescimento de outro, esta alteração, pode ter consequências positivas ou negativas consoante a microflora que passa a persistir na matriz (Novais, 1998; Jay, 2000; FDA, 2014).

A humidade relativa do ambiente, onde se encontra o género alimentício, está intimamente relacionada com a atividade da água do mesmo e com o desenvolvimento de microrganismos na sua superfície. Quando alimentos com valores baixos de  $a_w$  são submetidos a ambientes com valores elevados de humidade relativa, o alimento absorve a humidade do ambiente até estabelecer o equilíbrio, o mesmo acontece para a situação inversa, ou seja, uma matriz com elevado valor de  $a_w$ , quando exposta a um ambiente com níveis baixos de humidade relativa, perde humidade (Novais, 1998; Pampulha, 1998 Jay, 2000; FDA, 2014). A relação da humidade relativa com a temperatura é proporcionalmente inversa, isto é, quando a temperatura é elevada a humidade relativa é baixa e vice-versa. (Novais, 1998; Pampulha, 1998 Jay, 2000, FDA, 2014).

É importante ter em conta os fatores anteriormente referidos, quando se trata da segurança de géneros alimentícios, principalmente durante o seu acondicionamento e armazenamento (Jay, 2000).

## **2.4 Fases de desenvolvimento microbiano**

Os microrganismos podem proliferar, dividindo-se e aumentando em número, podem sofrer inativação ou morte, diminuindo em número, ou podem ainda manter-se num estado em que sobrevivem mas não se dividem, mantendo-se em número constante. Geralmente, o desenvolvimento microbiano pode ser segmentado em quatro fases distintas, sendo estas a fase de latência (fase lag), a exponencial, a estacionária e, por último, a de morte celular (figura 2.2) (Roszak & Colwell, 1987; Oliveira, 2009; Duarte, 2011).



**Figura 2.2-**Exemplo de curva de crescimento microbiano (Pampulha, 1998; Oliveira, 2009).

A fase lag ou de latência ocorre imediatamente após a inoculação das células no meio nutritivo. Nesta fase a população mantém-se, temporariamente, sem alterações. A fase lag pode ser descrita como o tempo necessário para a célula se adaptar ao novo ambiente, antes de se replicar. Esta etapa, quando comparada com as posteriores fases do crescimento microbiológico, é a mais imprevisível devido ao fato do ambiente em que os microrganismos se encontravam anteriormente ser distinto do ambiente em que são colocados, em consequência dessa alteração de meio é necessária uma fase de adaptação ao novo meio, na qual ocorrem as modificações celulares necessárias para o desenvolvimento. Assim, na fase lag não existe aumento do número de células, mas sim uma preparação por parte dos microrganismos, que sintetizam as enzimas necessárias para o crescimento no novo meio nutritivo (Roszak & Colwell, 1987; Oliveira, 2009).

A fase exponencial, também intitulada de fase logarítmica ou log, representa a fase em que ocorre a replicação logarítmica dos microrganismos. A divisão celular realiza-se a uma taxa constante que depende do potencial genético do microrganismo e das condições extrínsecas e intrínsecas em que este se encontra. Durante esta fase a reprodução encontra-se extremamente ativa e é portanto, um período com elevada atividade metabólica (Roszak & Colwell, 1987; Oliveira, 2009; Duarte, 2011).

Na fase estacionária, dá-se o ponto em que os microrganismos estão no seu número mais elevado e a sua multiplicação não é mais suportada, devido aos nutrientes estarem em esgotamento e os metabolitos em acumulação. Nesta etapa, o número de células que se divide é

equivalente ao número de células que morre, iniciando-se, então, a fase seguinte, de declínio ou morte celular. A última fase, a de declínio, caracteriza-se pela morte celular por consequência da perda da capacidade de replicação, ou seja, dá-se o decréscimo do número de células viáveis, ao longo do tempo. Nesta realiza-se o acontecimento inverso ao crescimento, durante a fase log. Apesar de nem sempre ser observado, os microrganismos podem sofrer a morte no próprio alimento, após um longo tempo de armazenamento (Roszak & Colwell, 1987; Oliveira, 2009; Duarte, 2011).

## 2.5 Microrganismos Relevantes

Desde sempre, os microrganismos e os alimentos encontram-se correlacionados. De fato o valor nutritivo dos alimentos faz com que estes também representem um meio ideal para o crescimento microbiano. Da associação entre os alimentos e os microrganismos, poderá resultar a conservação dos alimentos ou a sua contaminação, desta forma, os alimentos tanto podem sofrer uma transformação benéfica, por ação dos microrganismos, como podem ser contaminados por estes. Posto isto, o controlo e deteção de microrganismos de alteração e patogénicos é essencial (Novais, 1998; Heredia & Wesley, 2009).

Existem diversos microrganismos que podem encontrar-se numa extensa variedade de matrizes, mas determinados microrganismos, encontram-se particularmente, em certos alimentos. No quadro 2.7, evidenciam-se, alguns dos microrganismos associados à carne fresca (Novais, 1998; Heredia & Wesley, 2009).

A procura de proteína animal de elevada qualidade é crescente, sendo, por isto, cada vez maior a procura, por parte dos consumidores, de carne produzida com elevados níveis de qualidade e segurança. O rigor das normas de segurança alimentar, provocou um aumento da responsabilidade, por parte dos produtores e processadores, em regular e controlar as práticas de produção e em implementar métodos de controlo de microrganismos patogénicos (Novais, 1998; Heredia & Wesley, 2009). Na figura 2.3 apresenta-se a distribuição de surtos de origem alimentar por categoria de alimentos na União Europeia em 2012. Como se pode verificar pela observação da figura a maioria dos surtos de origem alimentar na União Europeia em 2012 relacionaram-se com produtos de origem animal, principalmente com os ovos e ovoprodutos (22%). Os surtos relacionados com carne de vaca e produtos derivados representaram cerca de 3,0% do total, enquanto que os relacionados com o consumo de carne de porco e derivados representaram cerca de 5,4% (EFSA/ECDC, 2014). No quadro 2.8 encontram-se algumas bactérias patogénicas que têm vindo a ser frequentemente associadas às carnes de vaca e de porco. Algumas destas, mais especificamente, a *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, serão abrangidas, de forma mais aprofundada, respectivamente, nos capítulos 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 e 2.5.4.

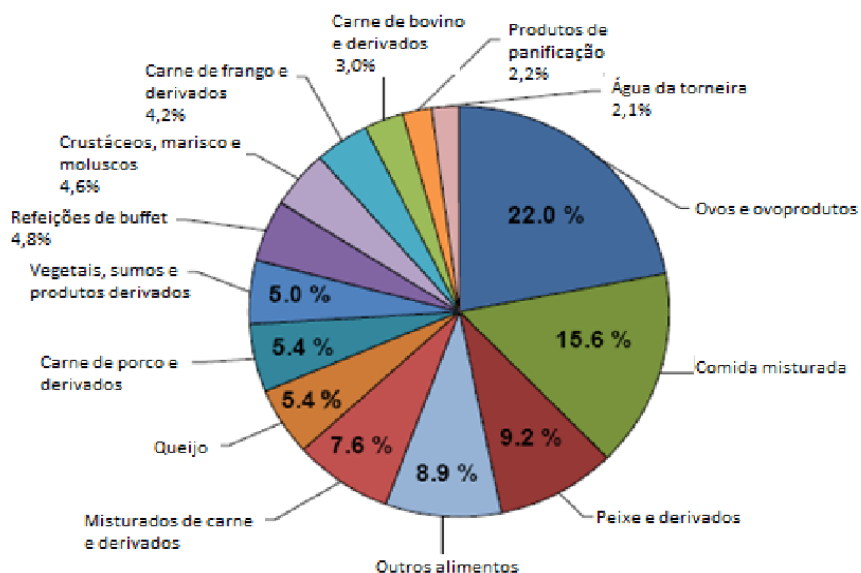
No quadro 2.7 encontram-se, em destaque, as bactérias em foco neste estudo, sendo dos microrganismos patogénicos mais frequentemente responsáveis pela contaminação de carnes



frescas de vaca e porco, sendo também diversas vezes responsáveis por doenças de origem alimentar.

**Quadro 2.7**-Microrganismos frequentemente encontrados em carnes frescas (adaptado de Jay et al., 2005).

MICRORGANISMOS		
<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Arcobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Brochothrix</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Caseobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Serratia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Listeria</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Weissella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Yersinia</i>



**Figura 2.3**-Distribuição de surtos de origem alimentar por categoria de alimentos na União Europeia em 2012 (EFSA/ECDC, 2014).

**Quadro 2.8-**Algumas bactérias patogénicas associadas às carnes de vaca e de porco (adaptado de Heredia & Wesley 2009)

TIPO DE CARNE	BACTÉRIAS
<b>Vaca</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Campylobacter</i>
<b>Porco</b>	<i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>

### 2.5.1 **Salmonella spp.**

A *Salmonella* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bacilo Gram-negativo. Este microrganismo constitui uma ameaça, uma vez que é capaz de infectar o ser humano, causando uma infecção designada genericamente por salmonelose. Esta bactéria pode ser transmitida pelo consumo de alimentos e água contaminados com células viáveis, ou por contacto oral-fecal. Muitas espécies de *Salmonella* são patogénicas, mas as características e severidade da doença causada é variável, existindo mais de 2300 serotipos. Dependendo da espécie, as infeções por *Salmonella* podem traduzir-se em diferentes síndromas, que incluem febre entérica, enterocolite e bacteriemia (Sousa, 2000; ASAE, 2014).

A *Salmonella* necessita de determinadas condições para que possa sobreviver e desenvolver-se nos alimentos (quadro 2.9). Os alimentos que mais frequentemente estão associados à contaminação por esta bactéria, são a carne, leite e ovos, outros alimentos como enchidos, peixe, fruta, molhos, bolos com creme e chocolate também se encontram relacionados com surtos de salmonelose (ASAE, 2014). No ano de 2012, os principais alimentos associados com surtos causados por *Salmonella* na União Europeia foram os ovos e ovoprodutos (45,2%), seguidos do queijo (7,8%). A proporção de surtos de salmonelose associados com a carne de vaca e produtos derivados foi de 2,0% e a com a carne de porco e produtos derivados foi de 5,8% (EFSA/ECDC, 2014).

**Quadro 2.9**-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de *Salmonella* (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014)

<b>TEMPERATURA</b>	Intervalo de sobrevivência	5 a 47°C
	Intervalo ótimo	35 a 37°C
<b>pH</b>	Intervalo de sobrevivência	3,8 a 9,3
	Intervalo ótimo	6,5 a 7,5
<b>a<sub>w</sub></b>	Intervalo de sobrevivência	0,94 a >0,99
	Valor ótimo	0,99
<b>RESPIRAÇÃO</b>	Anaeróbia facultativa	
<b>CONCENTRAÇÃO DE NaCl</b>	Intervalo de sobrevivência	3 a 4%

### 2.5.2 *Staphylococcus aureus*

Este microrganismo pertence à família *Micrococcaceae*, sendo uma bactéria Gram-positiva e caracteriza-se por possuir a forma de cocos (Cristino, 2000; ASAE, 2014). Algumas das bactérias desta família costumam viver em contacto íntimo com o homem, numa relação de mutualismo, encontrando-se, frequentemente, em regiões da pele e nas áreas mais próximas dos orifícios naturais do corpo, por outro lado, outras são identificadas como sendo dos principais microrganismos patogénicos, nomeadamente o *Staphylococcus aureus*. No total e até agora, foram descritas cerca 30 espécies (Cristino, 2000; ASAE, 2014).

Quando esta bactéria encontra condições propícias, pode produzir toxinas, mais especificamente, enterotoxinas, que são o agente causador da intoxicação alimentar. Geralmente, a intoxicação é originada pela ingestão dessas toxinas em alimentos, resultando em infeções que variam tanto na sua forma de manifestação, como na sua gravidade. Embora o *S. aureus* esteja presente nas membranas mucosas dos animais de sangue quente, é o próprio Homem, que ao manipular os alimentos, é o principal responsável pela contaminação com esta bactéria, estimando-se que 40% dos indivíduos saudáveis sejam portadores de *S. aureus* na nasofaringe (Cristino, 2000; ASAE, 2014).

As vacas produtoras de leite, quando infetadas com mastite, representam uma fonte de *S. aureus*, infetando principalmente o leite, por vezes, a sua carne crua também pode representar um perigo. Os alimentos que geralmente se encontram associados a intoxicações, por parte deste microrganismo, são os manipulados após o seu processamento e posteriormente, sujeitos a temperaturas de armazenamento entre os 10-45°C, anteriormente ao seu consumo, pois o *S. aureus* não possui uma grande capacidade de competição com outros microrganismos (ASAE, 2014). Esta bactéria consegue produzir toxinas a valores de a<sub>w</sub> de 0,87, embora o valor ótimo seja de 0,90. O crescimento e a produção de enterotoxinas estão mais favorecidos na presença de oxigénio, mas esta bactéria consegue fazê-lo, igualmente, em condições de anerobiose.

Concentrações de cerca de 80% de CO<sub>2</sub> inibem efetivamente o crescimento de *S. aureus* (Lawley *et al.*, 2008). As condições de crescimento e sobrevivência encontram-se nomeadas no quadro 2.10.

**Quadro 2.10**-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014).

<b>TEMPERATURA</b>	Intervalo de sobrevivência	7 a 48°C
	Intervalo ótimo	35 a 40°C
<b>pH</b>	Intervalo de sobrevivência	4,5 a 9,3
	Intervalo ótimo	6,0 a 7,0
<b>a<sub>w</sub></b>	Mínimo de sobrevivência	0,86
	Valor ótimo	0,98
<b>RESPIRAÇÃO</b>	Anaeróbia facultativa	
<b>CONCENTRAÇÃO DE NaCl</b>	Intervalo de sobrevivência	5 a 7%

### 2.5.3 *Listeria monocytogenes*

A *L.monocytogenes* é uma bactéria patogénica, pertencente à família *Listeriaceae*, caracterizando-se por ser um bacilo Gram-positivo. A este microrganismo, atribui-se a responsabilidade de vários casos isolados e surtos de listeriose, em animais e humanos. A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria de distribuição ubiqüitária, podendo ser encontrada, no solo, vegetais, carne e peixe. O homem e os animais podem ser portadores assintomáticos, consequentemente, a contaminação de matérias-primas e alimentos não processados, é frequente (Exposto, 2000; ASAE, 2014).

A principal via de contaminação do Homem é através do consumo de alimentos ou de água contaminados. A bactéria pode ser encontrada em alimentos crus ou processados e posteriormente contaminados. A confeção a temperaturas superiores a 65°C consegue destruir a *Listeria monocytogenes* mas esta, consegue multiplicar-se a temperaturas de +2/+4°C, o que faz com que a sua presença em produtos prontos a comer, com um tempo de prateleira relativamente longo, seja uma preocupação (quadro 2.11) (EFSA/ECDC, 2014).

A formação de biofilmes, é uma das capacidades da *L. monocytogenes*, como tal, a sua eliminação em processos de higienização é dificultada, pelo que deve ser foco de atenção em zonas de preparação e manuseamento de géneros alimentícios. A presença deste organismo nos alimentos, é um indicador de práticas de higienização deficientes, principalmente em alimentos sujeitos a tratamentos térmicos (ASAE, 2014).

**Quadro 2.11**-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014; ASAE, 2014).

<b>TEMPERATURA</b>	Intervalo de sobrevivência	0 a 45°C
	Intervalo ótimo	30 a 37°C
<b>pH</b>	Intervalo de sobrevivência	4,3 a 9,4
	Intervalo ótimo	6,0 a 8,0
<b>a<sub>w</sub></b>	Valor mínimo	0,92
<b>RESPIRAÇÃO</b>	Anaeróbia facultativa	
<b>CONCENTRAÇÃO DE NaCl</b>	Intervalo de sobrevivência	>10%

Os grupos de risco para esta infecção incluem os recém-nascidos, grávidas, crianças, idosos e imunocomprometidos. Os sintomas podem variar desde febre e diarreia até quadros de septicemia e meningite. Nas mulheres grávidas a infecção pode estender-se ao feto e causar a sua morte. (Lawley *et al.*, 2008). São vários os surtos de listeriose ligados ao consumo de alimentos, tais como, saladas, queijos, leite pasteurizado, pates e manteiga, mas os produtos que apresentam maior risco, são os que não passam por qualquer etapa de redução desta bactéria no processo de fabrico e cujas matérias-primas apresentam elevada concentração da mesma, fala-se então de alguns enchidos, laticínios produzidos com leite cru e peixe fumado (ASAE, 2014).

#### **2.5.4 *Escherichia coli***

A *E.coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, ou seja, à mesma família que a *Salmonella*, é um bacilo Gram-negativo, sendo algumas estirpes consideradas patogénicas para o Homem. Este microrganismo existe no trato intestinal dos mamíferos e por essa razão é frequentemente utilizado como indicador de contaminação fecal em alimentos e na água (Sousa, 2000; ASAE, 2014).

A maioria das estirpes de *Escherichia coli* não apresentam perigo para o hospedeiro, contudo, as estirpes de *E.coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), podem causar perturbações entéricas de maior ou menor gravidade (quadro 2.12). Nas estirpes EHEC encontram-se incluídos os serotipos de severidade mais elevada, associados à contaminação de alimentos, nomeadamente a *E.coli* O157:H7 e O104:H4 (Sousa, 2000; ASAE, 2014).

**Quadro 2.12**-Sintomas associados à infecção por *Escherichia coli* (adaptado de Jay et al., 2005; Lawley et al., 2008).

Estirpe de <i>E. coli</i>	Sintomas
<i>E.coli</i> enteropatogénica (EPEC)	Gastroenterite infantil em todos os países.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Diarreia do viajante e diarreias infantis em países menos desenvolvidos.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Febre, arrepios, dores abdominais intensas e diarreia aquosa podendo conter sangue.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Fortes dores de estômago, vômitos diarreia aquosa que passa a sanguinolenta. As toxinas podem chegar à circulação sistémica, levando ao colapso dos eritrócitos e formação de coágulos nos vasos sanguíneos dos rins e cérebro, podendo levar ao desenvolvimento do Síndrome Urémico Hemolítico.

Os surtos e casos pontuais causados por qualquer um dos tipos de *E.coli*, têm como principal motivo, a contaminação fecal da água ou de alimentos, devido a higienizações deficientes, más práticas de fabrico e higiene pessoal inadequada. Os alimentos que mais se encontram associados à contaminação por parte deste microrganismo, são os enchidos, alface, sumos de fruta não pasteurizados, leite cru, queijo e carnes mal cozinhadas, particularmente a de bovino (ASAE, 2014). Na União Europeia, o serotipo O157:H7 é dos serotipos da EHEC que mais vezes se encontra envolvido em casos de intoxicação alimentar. Contudo, no ano de 2011, ocorreu na Alemanha um surto de grandes proporções causado pelo serotipo O104:H4. Este surto foi associado ao consumo de rebentos de feno-grego e envolveu 3816 casos, dos quais resultaram 54 mortes (EFSA/ECDC, 2013).

Para que a *E coli* sobreviva e se desenvolva nos alimentos, são necessárias determinadas condições, algumas destas encontram-se descritas no quadro 2.13.

**Quadro 2.13**-Condições que permitem a sobrevivência e desenvolvimento de *Escherichia coli* (adaptado de Jay, 2000; Oliveira, 2009; FDA, 2014).

<b>TEMPERATURA</b>	Intervalo de sobrevivência	7 a 46°C
	Intervalo ótimo	35 a 40°C
<b>pH</b>	Valor mínimo	4,0
<b>a<sub>w</sub></b>	Valor mínimo	0,95
<b>RESPIRAÇÃO</b>	Anaeróbia facultativa	
<b>CONCENTRAÇÃO DE NaCl</b>	Valor máximo	6,5%

## 2.7 Modelos da microbiologia preditiva

É de grande importância para a microbiologia alimentar, poder calcular com antecedência o comportamento dos microrganismos nos alimentos, sob determinadas condições. Estes comportamentos podem ser traduzidos em modelos matemáticos que estimam o crescimento com ou sem fase lag, a inativação/sobrevivência, a produção de toxinas e a probabilidade de crescimento microbiológico e de morte. Existem várias classificações possíveis para os modelos da microbiologia preditiva, entre as quais se encontra a classificação em três níveis, descritos como primário, secundário e terciário (Nakashima *et al.*, 2000; Anastácio, 2009; Rodríguez & Valero, 2013).

Os modelos primários estimam, a partir de equações matemáticas, mais ou menos, complexas (figura 2.3), a alteração da contaminação microbiana de acordo com o tempo, num determinado ambiente. Os modelos primários incluem os modelos de crescimento, de inativação/sobrevivência, entre outros anteriormente referidos. Os modelos secundários descrevem o efeito das condições ambientais nos parâmetros do modelo primário, isto é, relatam a forma como os resultados dos modelos primários são afetados por um ou vários fatores ambientais, podendo estes ser intrínsecos ou extrínsecos, como por exemplo, a atividade da água, a temperatura, ou o pH, entre vários outros. Por último, os modelos terciários são uma implementação de ambos os modelos anteriores, em ferramentas computacionais, que se destinam a fornecer predições. Estes modelos baseiam-se em *softwares* que providenciam uma ligação entre a matemática subjacente e o utilizador, permitindo que este observe a resposta através de quadros ou gráficos simplificados. Neste ponto incluem-se algoritmos para calcular as alterações das condições sob o crescimento e sobrevivência dos microrganismos, para comparar o comportamento microbiano sob condições diferentes e modelar o crescimento de vários microrganismos em simultâneo (Nakashima *et al.*, 2000; Anastácio, 2009; Duarte, 2011; Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013). Alguns exemplos de modelos terciários, isto é, de ferramentas preditivas ou *softwares* preditivos, encontram-se descritos no capítulo seguinte (2.7.1)

**Modelo Exponencial**  $Log(N_t) = Log[N_0 \times \exp(\mu_{max} \times time)]$

**Modelo Logístico sem fase lag**  $Log(N_t) = Log\left(\frac{N_{max}}{1 + \left[\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right] \times \exp(-\mu_{max} \times time)}\right)$

**Modelo Logístico com fase lag**  $Log(N_t) = Log\left(N_{min} + \frac{N_{max} - N_{min}}{1 + \exp(-\mu_{max}(time - t_l))}\right)$

**Modelo de Baranyi & Roberts (1994)**

$$Log(N_t) = Log(N_0) + \frac{1}{\mu_{max}} \times \left[ time + \frac{1}{\mu_{max}} \times Ln\left(\frac{\exp(-\mu_{max} \times time) + q_0}{1 + q_0}\right) \right] - \frac{1}{Log(10)} \times Ln\left(1 + \frac{\exp\left(\mu_{max} \times \left[ time + \frac{1}{\mu_{max}} \times Ln\left(\frac{\exp(-\mu_{max} \times time) + q_0}{1 + q_0}\right) \right]\right) - 1}{\exp(Log(N_{max}) - Log(N_0))}\right)$$

**Modelo modificado de Gompertz**  $Log(N_t) = Log(N_0) + (A \times \exp\left(-\exp\left[\frac{\mu_{max} \times \exp(1)}{A} \times (lag - time) + 1\right]\right)) / Ln(10)$

**Figura 2.4-**Alguns exemplos de modelos primários que medem a resposta dos microrganismos (adaptado de Fakruddin et al., 2011).

### 2.7.1 Softwares preditivos

Os modelos terciários demonstram ser ferramentas vantajosas, para o utilizador, na previsão de crescimento, sobrevivência e inativação de microrganismos patogénicos e deterioradores de alimentos, em diferentes matrizes alimentares. Estas ferramentas, foram construídas para uma vasta gama de aplicações e para vários tipos de utilizadores. Com o desenvolvimento das tecnologias de comunicação e informação, o número de ferramentas disponíveis para a microbiologia preditiva, aumentou significativamente. Hoje em dia, existem vários *softwares* disponíveis, principalmente via *internet*, de acesso gratuito para qualquer indivíduo que deles queira usufruir. No quadro 2.14 apresentam-se alguns exemplos destes *softwares* (Rodríguez & Valero, 2013).

**Quadro 2.14-**Ferramentas auxiliares da Microbiologia Preditiva disponíveis online e as respetivas entidades oficiais criadoras (adaptado de Rodríguez & Valero, 2013).

<b>PATHOGEN MODELING PROGRAM (PMP)</b>	<a href="http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550">http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550</a>	USDA-ARS ERRC
<b>COMBASE PREDICTOR</b>	<a href="http://www.combase.cc">http://www.combase.cc</a>	IFR
<b>SEAFOOD SPOILAGE AND SAFETY PREDICTOR (SSSP)</b>	<a href="http://www.sssp.dtuaqua.dk">http://www.sssp.dtuaqua.dk</a>	DTU Aqua
<b>SYMPREVIUS</b>	<a href="http://www.symprevius.net">http://www.symprevius.net</a>	INRA
<b>MICROHIBRO</b>	<a href="http://www.microhibro.com">http://www.microhibro.com</a>	UCO
<b>PURAC</b>	<a href="http://www.purac.com/EN/Food/Purac-calculators/Listeria-Control-Model.aspx">http://www.purac.com/EN/Food/Purac-calculators/Listeria-Control-Model.aspx</a>	PURAC
<b>THERM</b>	<a href="http://www.meathaccp.wisc.edu/THERM/Calc.aspx">http://www.meathaccp.wisc.edu/THERM/Calc.aspx</a>	WISC



Algumas das ferramentas com maior frequência de utilização e investigação, são o *Pathogen Modeling Program* (PMP) e o *ComBase Predictor*, podendo ser considerados os *softwares* pioneiros na microbiologia preditiva. As duas plataformas regem-se pela mesma filosofia, sendo que são modelos desenvolvidos por entidades oficiais e cientistas, convertendo-se numa ferramenta acessível ao utilizador (Rodríguez & Valero, 2013).

### 2.7.1.1 Pathogen Modeling Program (PMP)

O *Pathogen Modeling Program* é uma ferramenta desenvolvida pelo *U.S Department of Agriculture-Agricultural Research Center* (USDA-ARS) e *Eastern Regional Research Center* (ERRC) e foi construída, maioritariamente, sobre modelos de crescimento e inativação de várias bactérias patogénicas, tais como, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, entre outras. O modelo primário que se encontra na base do PMP é o modelo de Gompertz. Este *software* fornece aos seus utilizadores, estimativas do tempo de crescimento bacteriano, da duração da fase lag e gráficos das curvas cinéticas. Neste momento, a ferramenta encontra-se na sua sétima versão e está disponível no portal do PMP (quadro 2.14) (Duarte, 2011; ARS.USDA, 2013; Rodríguez & Valero, 2013).

Na figura 2.5, encontra-se disponível para visualização, a página inicial de acesso ao PMP online. Nesta página, é possível selecionar o tipo de modelo preditivo que se pretende, consoante os modelos e respetivos microrganismos, como explícito na figura 2.5, ou através do microrganismo e modelo correspondente, como visível na figura 2.6.

United States Department Of Agriculture  
Agricultural Research Service

ERRC  
EASTERN REGIONAL RESEARCH CENTER

**Pathogen Modeling Program (PMP) Online**

You are here: [PMP Home](#) / [PMP Online](#)

**\*PMP Online**

- ◊PMP Home
- ◊About PMP
- ◊Tutorial
- ◊Frequently Asked Questions
- ◊References

Models >> Bacterium >> Bacteria >> Model

Model	Pathogen
Cooling	
Growth	
Heat Inactivation	
Survival	
Transfer	
Salmonella Dublin in Sterile Ground Chicken Burgers	<i>Salmonella</i>
Salmonella Enteritidis in Sterile Ground Chicken Burgers	<i>Salmonella</i>
Salmonella Hadar on Chicken Skin	<i>Salmonella</i>
Salmonella Kentucky on Chicken Skin	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium in Chicken Frankfurters	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium on Chicken Skin (Regression)	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium on Chicken Skin (Neural Network)	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium on Refrigerated Chicken Skin	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium in Sterile Ground Chicken Portions	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium in Sterile Ground Chicken Burgers	<i>Salmonella</i>
Salmonella Typhimurium in Ground Chicken	<i>Salmonella</i>
Salmonella spp. in Ground Beef	<i>Salmonella</i>
Salmonella spp. in Ground Chicken	<i>Salmonella</i>
Yersinia pseudotuberculosis in Ground Beef	<i>Yersinia</i>
Aeromonas hydrophila	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Bacillus cereus	<i>Bacillus cereus</i>
Escherichia coli [O157:H7]	<i>Escherichia coli</i> [O157:H7]
Listeria monocytogenes	<i>Listeria monocytogenes</i>
Shigella flexneri	<i>Shigella flexneri</i>
Staphylococcus aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>

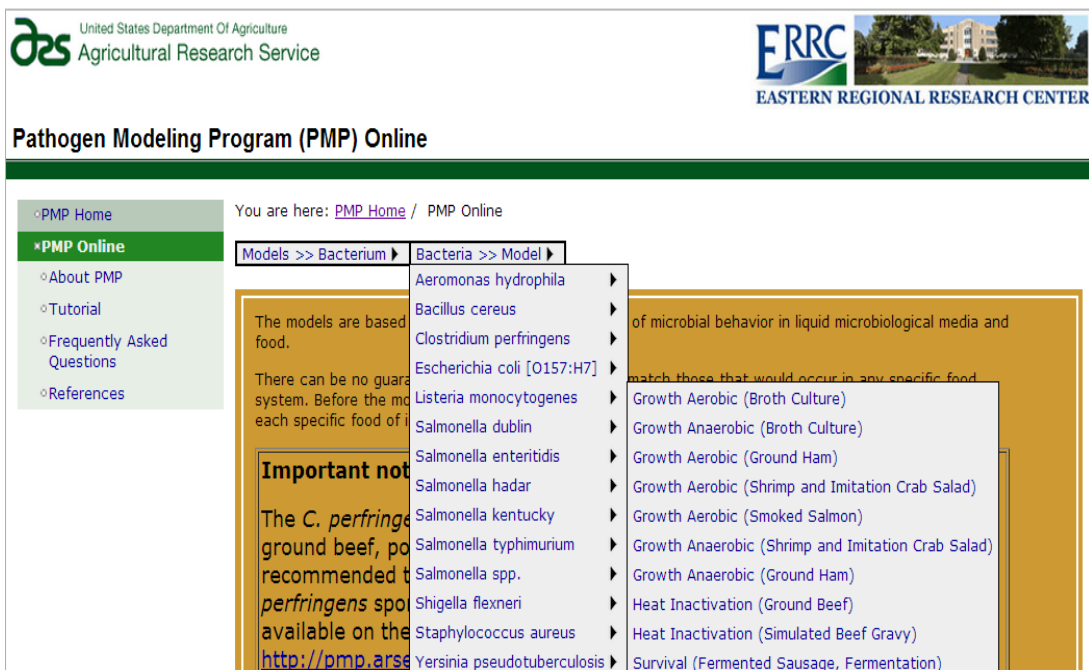
**Important notice:**

The *C. perfringens* Predictive Model for ground beef, pork or chicken is available on the web at <http://pmp.arserrc.gov>

For any queries regarding Microbiology Research, contact Dr. Vijay Juneja, phone (610) 647-1111, or Dr. Andy Hwang, phone (610) 647-1111.

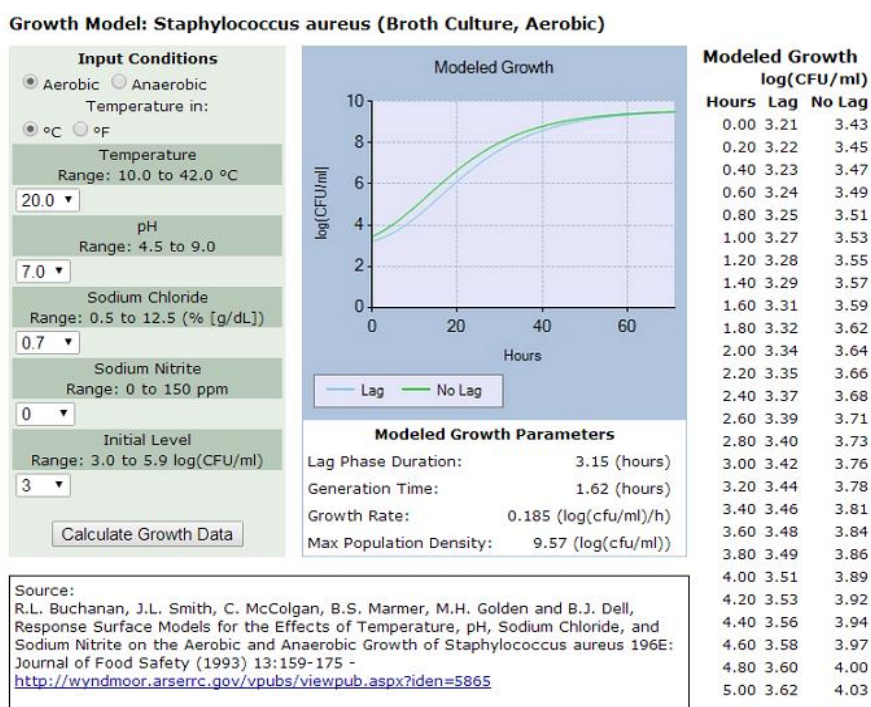
[pmp.arserrc.gov](http://pmp.arserrc.gov)

**Figura 2.5**—Página inicial do PMP online, seleção do modelo preditivo consoante os modelos e respetivos microrganismos (adaptado de ARS.USDA, 2014).



**Figura 2.6**-Página inicial do PMP online, seleção do modelo preditivo consoante os microrganismos e modelos (adaptado de ARS.USDA, 2014).

Posteriormente à seleção do modelo, surge, imediatamente, na zona inferior da janela, um campo de preenchimento das condições do meio envolvente, ou seja, alguns dos fatores extrínsecos e intrínsecos, como é visível na figura 2.7. Após o preenchimento correto dos campos, verifica-se o aparecimento dos resultados da previsão pretendida, em gráfico e em quadro, em que ambos, exibem o crescimento do microrganismo em log de UFC/mL, consoante o tempo, em horas. Ambas as formas de apresentação dos resultados, ou seja, o quadro e o gráfico, apresentam os seus dados, com alusão, ou não, à fase lag, como manifesta a figura 2.7.



**Figura 2.7**-Exemplo dos resultados de uma previsão pelo PMP online (adaptado de ARS.USDA, 2014).

Tal como, qualquer outro *software* preditivo, este também encontra algumas limitações. Em primeiro plano, cinge-se a uma reduzida variedade de alimentos, em segundo plano, como visível na figura 2.7, a temperatura, o pH, o cloreto de sódio, o nitrito de sódio e o nível inicial de contaminação, possuem valores limitativos, permitindo apenas uma seleção de valores predefinida. Em terceiro plano, não abrange o fator  $a_w$ . É de focar, principalmente, que o nível inicial de microrganismos não pode ser menor que 3 log UFC/g ( $10^3$  UFC/g) e o valor de NaCl não pode ser inferior a 0,5%, constituindo estas particularidades, uma barreira no que respeita à introdução de dados pelo utilizador (Duarte, 2011; Rodríguez & Valero, 2013; ARS.USDA, 2014).

### **2.7.1.2 ComBase Predictor**

O ComBase Predictor ou Combined DataBase, tal como o PMP, é uma ferramenta grátis e disponível online, que permite prever a resposta de diferentes microrganismos a fatores ambientais. Esta ferramenta foi criada pelo *Institute of Food Research* (IFR), mas recentemente, tem vindo a ser desenvolvida pela sua entidade criadora em colaboração com o USDA-ARS e o *Food Safety Center in Australia* (FSC). O modelo primário utilizado, por esta ferramenta preditiva, é o de Baranyi & Roberts (1994). O ComBase encontra-se disponível para consulta, mediante login prévio, no seu portal oficial, que se encontra referido no quadro 2.14 (Rodríguez & Valero, 2013; ComBase, 2014).

Na generalidade, os *softwares* preditivos, possuem diferenças significativas entre si, o PMP e o ComBase não são uma exceção. Em contraste com o PMP, o ComBase, consegue prever o crescimento e sobrevivência de microrganismos em função do pH, temperatura,  $a_w$  ou concentração de NaCl, do dióxido de carbono ou ácidos orgânicos. Outra diferença reside no fato do ComBase incluir bactérias deterioradoras, como por exemplo, as bactérias lácticas. O fato deste *software* permitir obter previsões sob temperaturas dinâmicas, possibilitando introduzir perfis de tempo-temperatura para todos os microrganismos que abrange, marca mais uma diferença entre estas duas ferramentas da Microbiologia Preditiva. Acrescentando que, o ComBase pode produzir previsões simultâneas, para até quatro microrganismos (Rodríguez & Valero, 2013)

Na plataforma online do ComBase, é necessário efetuar o *login* para proceder à utilização das ferramentas disponíveis. Na figura 2.8 encontra-se a página disponível imediatamente após login. Esta página permite ter acesso a todos os modelos disponíveis, estando estes divididos em *ComBase Predictor*, que incluem os modelos de crescimento, de inativação térmica e de sobrevivência e em Outros modelos, que abrangem o *Perfringens Predictor* e o *Salmonella in Egg*, como visível na figura 2.9. Ao selecionar o modelo pretendido, neste caso, o modelo de crescimento, pois é este que é utilizado nesta pesquisa, aparece a página que se encontra demonstrada na figura 2.10.

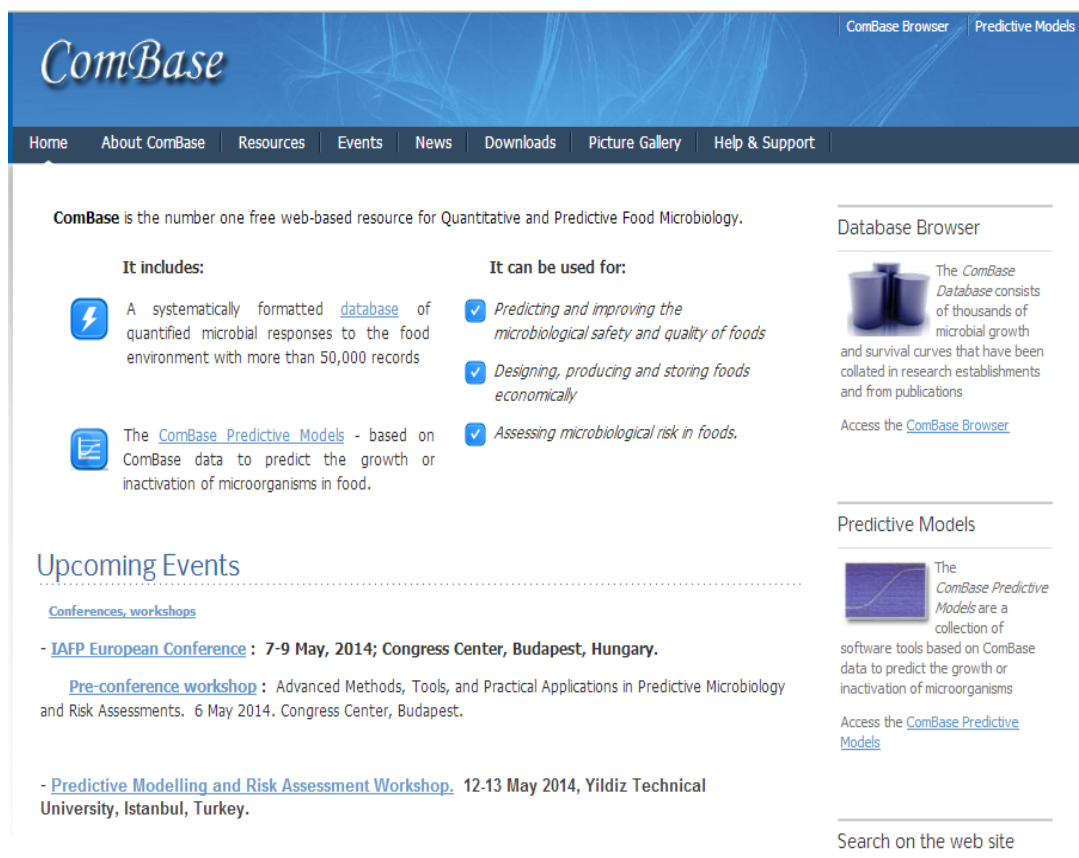


Figura 2.8-Página inicial do programa ComBase online (adaptado de ComBase, 2014).

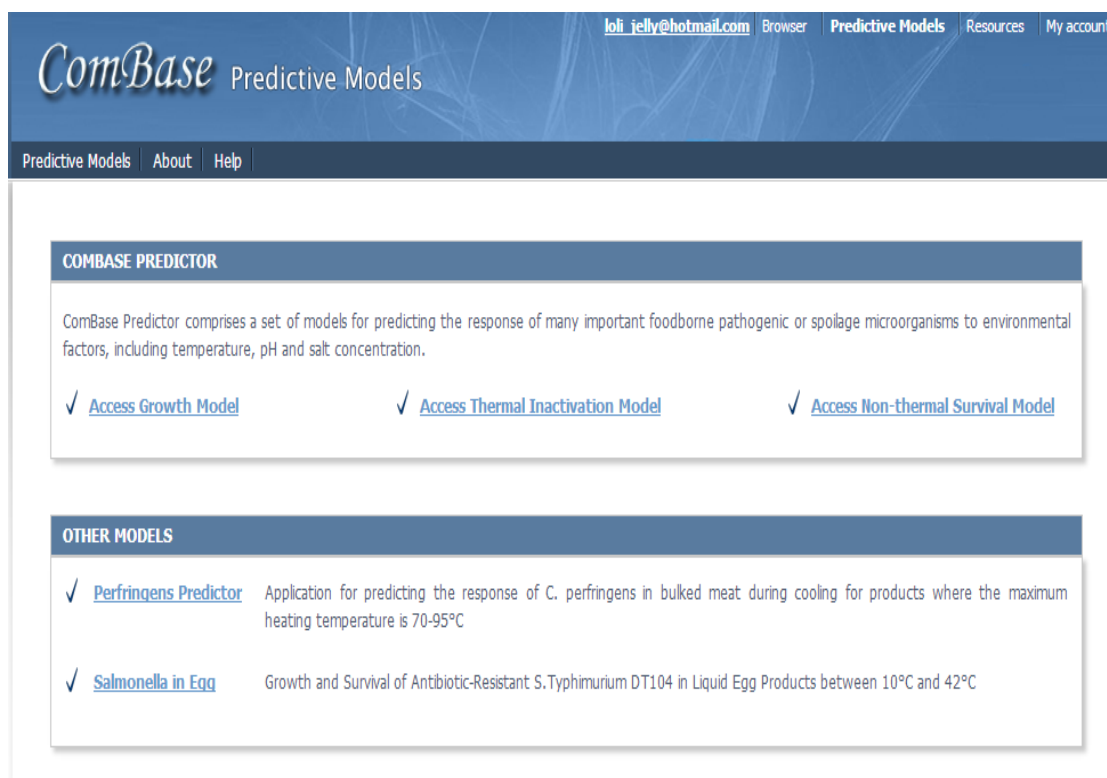
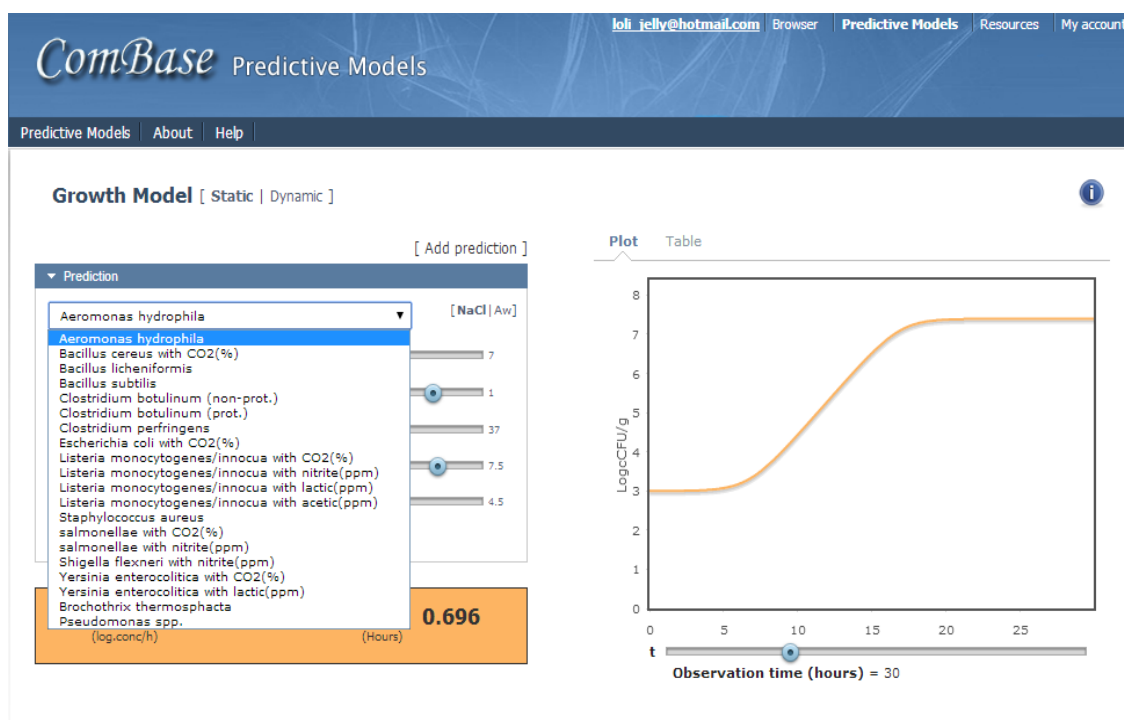


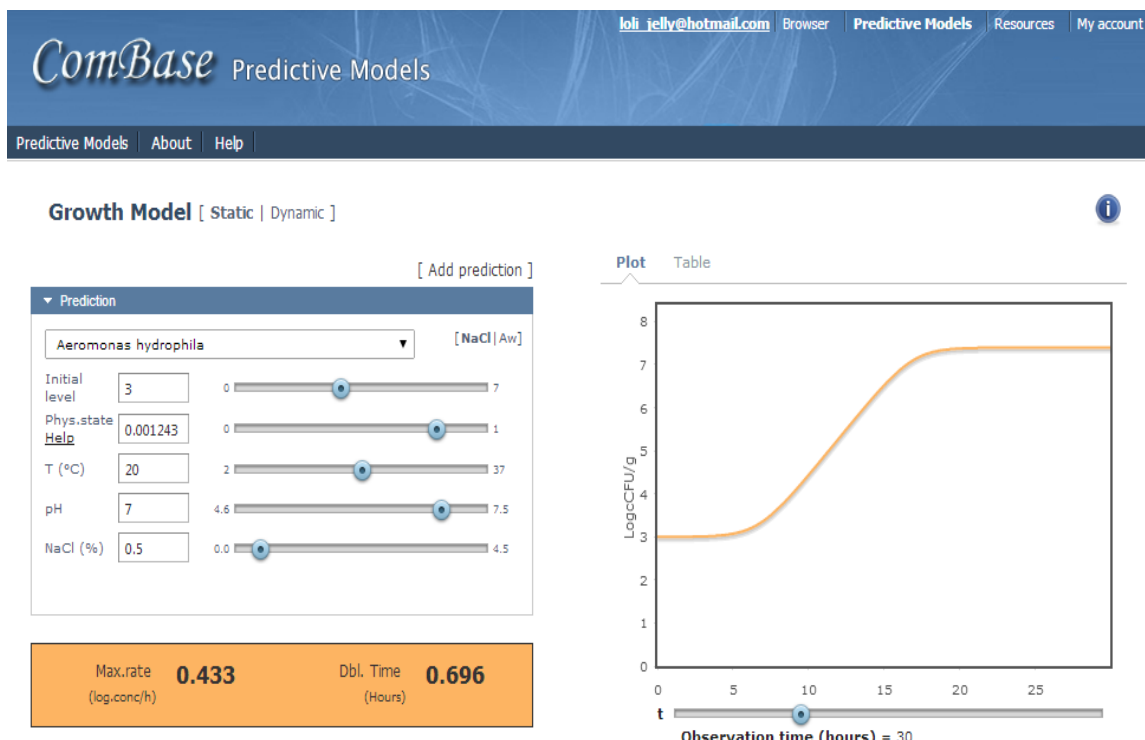
Figura 2.9-Página, após login, dos modelos preditivos na plataforma online do ComBase (adaptado de ComBase, 2014).

Na página que se visualiza na figura 2.10, é necessário fazer a seleção do microrganismo pretendido e dos valores dos fatores intrínsecos e extrínsecos. Para além disto, é necessário efetuar a escolha entre dois fatores, NaCl ou o  $a_w$  para se proceder com a previsão. Como já referido, existem campos a serem preenchidos, tais como, o nível inicial de contaminação, a temperatura, o pH, o NaCl ou  $a_w$  e o estado fisiológico inicial (Phys. State), sendo este último, um número compreendido entre 1 e 0, que expressa a adaptação física das células ao meio, se o seu valor for igual a 0, o crescimento não ocorrerá, ou seja, Lag infinito, mas se o seu valor for igual a 1, então o crescimento iniciar-se-á de imediato, sem fase Lag. É assumido um valor geral, específico para cada microrganismo pelo próprio *software*, quando este campo não é preenchido manualmente.

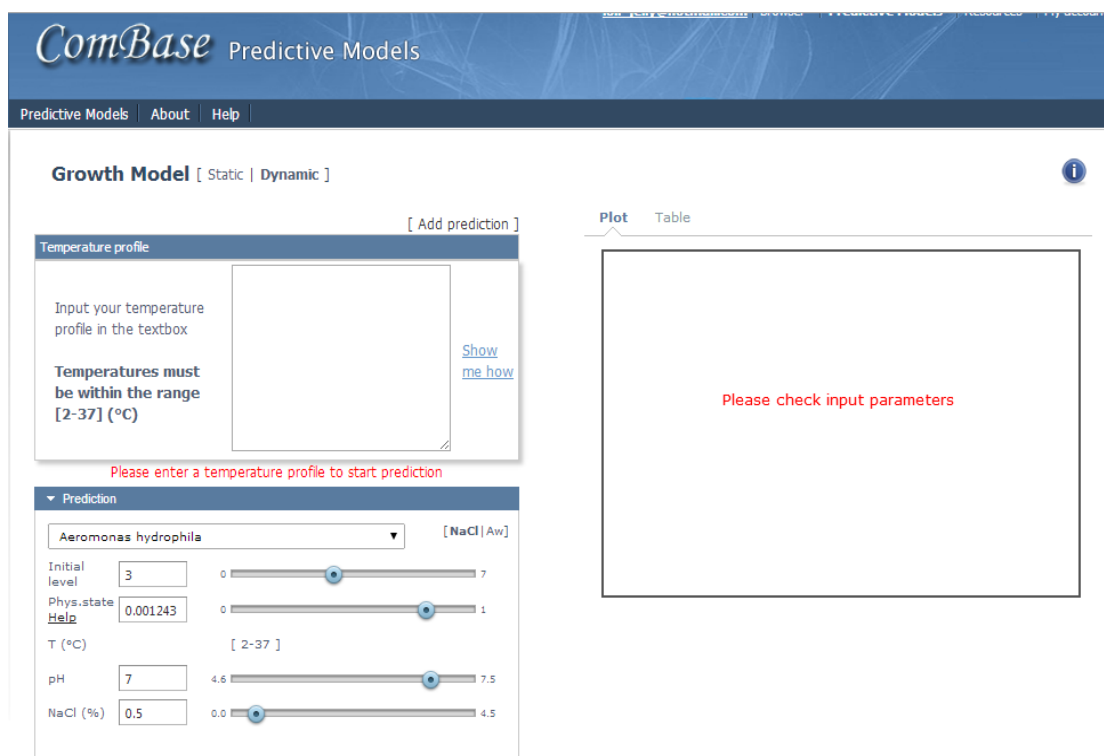


**Figura 2.10**-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com seleção do microrganismo pretendido (adaptado de ComBase, 2014).

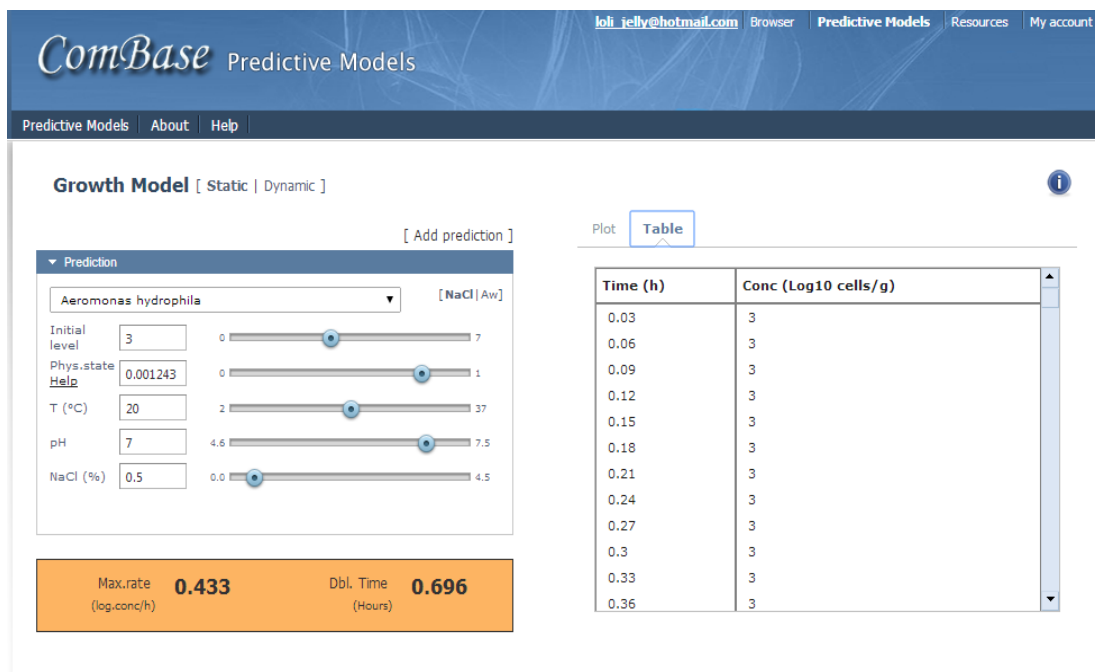
Neste modelo é permitido efetuar o preenchimento dos dados, de forma estática ou dinâmica, isto é, se for de forma estática preenchem-se os campos disponíveis na página, tal como, na figura 2.11, na dinâmica, preenche-se um perfil dinâmico de tempo/temperatura, como é visível na figura 2.12. Quando se efetua uma previsão nesta ferramenta, os resultados são apresentados de duas formas, isto é, através de um gráfico, como exemplificado na figura 2.11 e através de um quadro, como na figura 2.13.



**Figura 2.11**-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com introdução estática de dados e apresentação do resultado em gráfico (adaptado de ComBase, 2014).

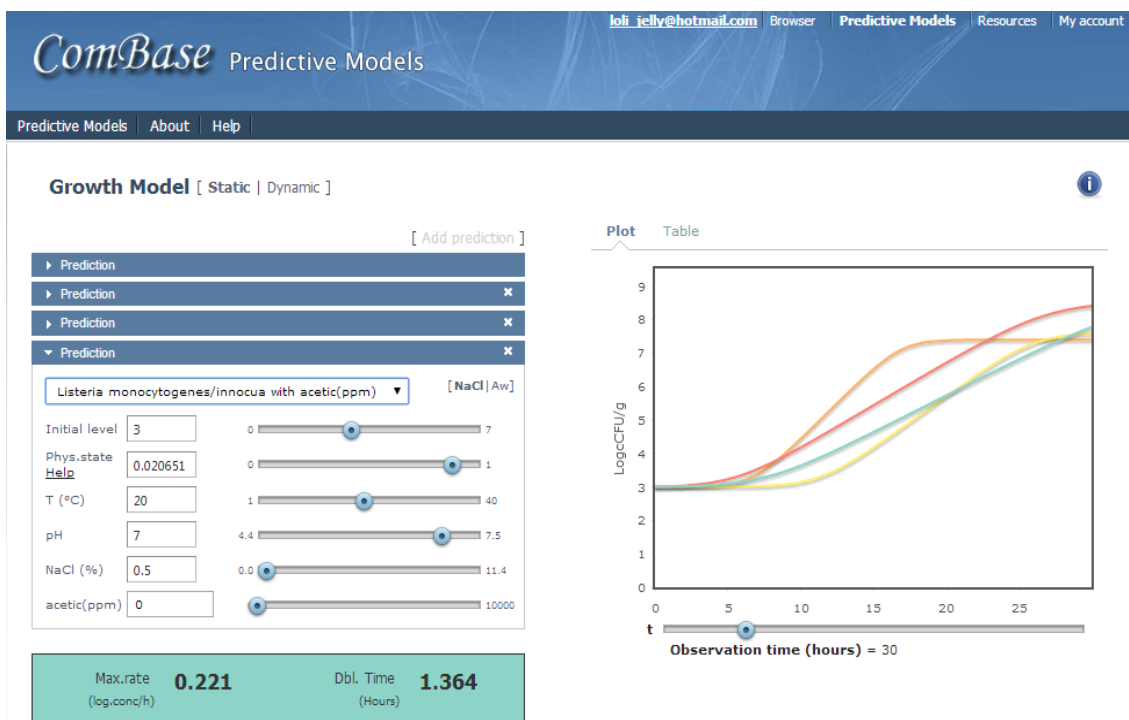


**Figura 2.12**-Exemplo da página do modelo de crescimento do ComBase Predictor, online, com introdução dinâmica de dados (adaptado de ComBase, 2014).



**Figura 2.13**-Exemplo da página do modelo de crescimento da ferramenta ComBase Predictor online, apresentação do resultado em quadro (adaptado de ComBase, 2014).

Como referido anteriormente, esta ferramenta distingue-se por possuir a capacidade de efetuar varias previsões em simultâneo, na figura 2.14, visualiza-se quatro previsões concomitantes, realizadas com microrganismos distintos e valores diferentes nos variados fatores. A sua principal limitação deve-se a que os valores mínimos admitidos de  $a_w$ , são elevados e os intervalos de temperatura que abrange, são reduzidos, para determinados microrganismos.



**Figura 2.14**-Exemplo da página do modelo de crescimento da ferramenta ComBase Predictor online, apresentação de 4 previsões em simultâneo (adaptado de ComBase, 2014)



### **2.7.2 Limitações dos modelos preditivos**

Existem algumas limitações nos modelos terciários ou *softwares* preditivos, como anteriormente verificado. A primeira restrição deve-se a que, estes modelos, não podem ser extrapolados fora dos intervalos nos quais foram baseados, pois derivam de um ajuste de dados observados anteriormente. Previsões fora dos limites experimentais, geralmente não são exatas e em certos casos, podem não fazer sentido. Geralmente, estes modelos prevêem taxas de crescimento mais elevadas do que as observadas e isto torna-os demasiado conservadores ou falsamente seguros. A razão deste acontecimento, deve-se ao fato dos modelos serem geralmente construídos com base em dados obtidos em meios laboratoriais controlados (Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

Vários investigadores defendem que modelos obtidos a partir de condições estáticas não devem ser aplicados a condições variáveis, como por exemplo, a temperatura, o pH, a atmosfera gasosa e  $a_w$  variáveis durante a vida do produto. É necessária alguma precaução na utilização de modelos preditivos, pois existem dúvidas de que modelos derivados dum sistema experimental controlado, possam prever seguramente, o crescimento de microrganismos em alimentos em situações reais. O utilizador de qualquer modelo microbiológico preditivo deve estar alerta de que a utilização do mesmo fora das suas limitações, pode não facultar uma resposta válida ou lógica (Rodríguez & Valero, 2013).

### **2.7.3 Desafios da microbiologia preditiva e ferramentas preditivas**

Ao longo dos anos, os investigadores têm apontado e discutido problemas referentes à microbiologia preditiva e muitos chegaram à conclusão que era necessária mais investigação. Apesar disto, um progresso e esforço considerável têm sido feitos de forma a definir abordagens teóricas e protocolos experimentais para o desenvolvimento e publicação de modelos preditivos. Como consequência, mais estudos de validação são necessários, particularmente estudos que envolvam ensaios individuais e baseados em dados das indústrias. Hoje em dia, a opinião sobre a eficácia dos modelos relativamente a situações reais não é unânime, pois a sua capacidade de previsão de resultados, em condições reais, é ainda contraditória (Fakruddin *et al.*, 2011).

Os modelos desenvolvidos em laboratório, em condições de crescimento em meios de cultura, têm demonstrado nem sempre ser apropriados para descrever o comportamento dos microrganismos nos alimentos. Como tal, estes modelos devem ser validados rigorosamente sob condições práticas e reais, de forma a avaliar a sua fiabilidade, antes de serem utilizados no auxílio de decisões importantes. Para efetuar a validação de um modelo, após a sua construção, é necessário, numa primeira etapa, efetuar uma validação interna, testando a sua precisão com novos dados e novas combinações de variáveis, para determinar se o modelo consegue descrever claramente os dados experimentais. Posteriormente uma validação externa também é necessária, sendo que esta se baseia na comparação entre os resultados do modelo preditivo e os resultados reais microbiológicos obtidos em alimentos. Esta comparação demonstra as limitações do modelo e



pode demonstrar se fatores adicionais deverão ser incluídos no modelo em questão (Fakruddin *et al.*, 2011).

Em condições reais, as situações podem desviar-se das predições efetuadas pelos modelos preditivos, mas este tipo de desvios não implicam que o modelo seja defeituoso, mas que, provavelmente, o conhecimento de alguns ecossistemas alimentares se encontra incompleto e que outros fatores, para além dos que se encontram no modelo, possuem um efeito no comportamento microbiano. O tema comum dos problemas na microbiologia preditiva é a incerteza, ou seja, incerteza em termos das condições iniciais e em relação à resposta microbiana num ambiente variável. A variabilidade inerente aos tempos de resposta, por parte dos microrganismos, é um problema. Outra dificuldade deve-se ao fato de ser extremamente difícil prever a duração da fase lag nos alimentos. Os organismos que se encontram nos alimentos, podem incluir células, em fase exponencial, em fase lag, células danificadas mas em reparação, células viáveis mas incapazes de crescerem, por ineficácia dos mecanismos de reparação, ou células mortas, constituindo mais uma dificuldade. Métodos para definir o estado fisiológico de microrganismos contaminantes de alimentos, necessitam de ser desenvolvidos (Fakruddin *et al.*, 2011).

#### **2.7.4 Perspectivas futuras para os modelos preditivos**

Existem expectativas relativas a um progresso da microbiologia preditiva em variadas áreas, tais como, a modelagem dinâmica (interação entre as bactérias e os fatores ambientais); a modelagem da fase lag; a microbiologia computacional e desenvolvimento da bioinformática com a possibilidade de armazenamento e recuperação de dados de uma forma mais avançada e o relacionamento da microbiologia preditiva com a microbiologia molecular usando dados sobre como os genes são ativados em função do ambiente (Nakashima *et al.*, 2000; Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).

No futuro será também importante a modelação matemática de crescimento fúngico nos alimentos que, até agora, não obteve o mesmo grau de interesse que a modelagem do crescimento bacteriano. O desenvolvimento de modelos que se apliquem ao crescimento microbiológico em alimentos heterogêneos, em microambientes e biofilmes, também são extremamente necessários. Pesquisas adicionais são necessárias e esperadas nas próximas décadas, para complementar informações e para produzir modelos mais adequados a serem aplicados a situações reais e práticas. (Nakashima *et al.*, 2000; Fakruddin *et al.*, 2011; Rodríguez & Valero, 2013).



### 3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

#### 3.1 SGS – Sociedade Geral de Superintendência, S.A.

A empresa SGS foi inicialmente fundada, na cidade de Rouen, localizada no noroeste de França, em 1878, como um entreposto Francês para a inspeção do comércio internacional de cereais a granel. A companhia foi registada em 1919, em Genebra, como Société Générale. Hoje em dia, a empresa,   uma das maiores organiza  es mundiais, no domínio da Inspe  o, Verifica  o, Análise e Certifica  o. Possui, neste momento, sede em Genebra, Su  a e está presente em cerca de 140 países, operando em mais de 1 500 escritórios e laboratórios, contando com 80 000 colaboradores em todo o mundo

O laboratório agroalimentar SGS foi criado em 1989 com o objectivo de proporcionar suporte ao controlo de opera  es de cereais. Desse momento em diante, iniciou-se o desenvolvimento de análises microbiológicas clássicas, possuindo agora uma posi  o possante e sólida no mercado, a nível de análises nutricionais. Na atualidade, a empresa possui diversos laboratórios qualificados nas áreas agroalimentar, ambiental, segurança ocupacional, detergentes, produtos de higiene e cosméticos, dispositivos médicos e Ensaio não Destrutivos, assegurando que os seus produtos satisfazem os parâmetros internacionais, defendendo a segurança do consumidor.

Em Portugal, a SGS foi fundada em 1922, pelo grupo SGS, tendo estabelecido que esta afiliada (SGS Portugal) desenvolvesse a sua atividade sempre associada a valores como a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inova  o. Originalmente, a SGS Portugal encontrava-se dedicada ao controlo de opera  es de carga e descarga de cereais a granel, posteriormente foi alargando a sua atividade a outros setores adaptando-se às exigências do mercado. Atualmente os principais serviços prestados, encontram-se divididos em quatro categorias:

**Inspe  o:** A SGS, como líder mundial, em serviços de inspe  o e verifica  o, oferece ao público, um leque de serviços que passam pela verifica  o da condi  o e do peso dos bens comercializados, no momento de transporte, visando ajudar no controlo de quantidade e qualidade das mercadorias e em paralelo cumprir com todos os requisitos regulamentares de diferentes regiões e mercados.

**Análise:** Através de profissionais especializados e experientes, a rede global de laboratórios, para realiza  o de análises, d   apoio na redu  o de riscos, na agiliza  o de processos dos seus clientes e na verifica  o da qualidade, segurança e desempenho dos produtos, de acordo com as normas regulamentares de saúde e segurança

**Verifica  o:** Enquanto líder em verifica  o, a SGS oferece níveis incomparáveis de precisão, especialistas altamente experientes, as mais avançadas metodologias de análises e alcance global. Permite ajudar o cliente a garantir a conformidade dos seus produtos, serviços e processos com as normas nacionais e internacionais, seja qual for o setor em questão.

**Certificação:** A SGS permite ainda a certificação dos produtos, processos e sistemas de gestão dos seus clientes, com base na conformidade com as normas e regulamentações nacionais e internacionais ou com as normas definidas pelo cliente.

A visão da empresa SGS passa por pretender ser a organização de serviços mais competitiva e produtiva do mundo, em que as suas principais competências, ou seja, inspeção, análise, verificação e certificação, são a essência da sua natureza e são alvo de melhoria contínua no sentido de alcançar a excelência. Os mercados de ação são determinados em função da capacidade de competição da empresa e do fornecimento de serviços diferenciadores aos seus clientes tanto nacionais como internacionais

Os principais valores da empresa passam pela integridade, paixão, espírito empreendedor e esforço contínuo em concretizar a sua visão e são estes que servem de alicerce à organização. A empresa aplica esforços contínuos de forma a exceder as expectativas dos seus clientes e da própria sociedade, como forma de oferecer serviços líderes no mercado, onde estes sejam necessários. A empresa é líder em soluções empresariais especializadas que visam aumentar a qualidade, segurança e produtividade em paralelo com a redução de riscos, de forma a ajudar os seus clientes a defrontarem as regulamentações cada vez mais frequentes e exigentes. A empresa ainda fornece serviços que adicionam um valor significativo às operações dos seus clientes, garantindo a sustentabilidade dos negócios e promovendo o desenvolvimento sustentável. A SGS encara a sustentabilidade como uma forma de gerir um negócio lucrativo a longo prazo, considerando todos os efeitos ambientais, sociais e económicos acarretados pela sociedade. A SGS Portugal (figura 3.1) encontra-se, agora, em telheiras, mais especificamente no Pólo Tecnológico de Lisboa e é aprovisionada, resumidamente, por uma sala de receção de amostras, um laboratório de química e um de microbiologia, onde decorreu, em parte, o desenvolvimento desta dissertação.



**Figura 3.1-**Logotipo da empresa SGS, S.A.

A empresa SGS age no intuito de respeitar e proteger informações confidenciais que lhes são confiadas pelos seus clientes e como tal, toma medidas preventivas de forma a evitar a divulgação accidental de informação. Desta forma, a SGS obtém e mantém apenas os dados necessários dos clientes, para operar eficazmente o seu negócio e para cumprir com as normas legais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras alimentares adquiridas, para a execução desta investigação, não foram recolhidas pelo estagiário, mas por um profissional competente responsável por essa atividade. Todas as amostras manuseadas pelo estagiário pertencem a clientes que operam com o laboratório microbiológico da empresa SGS. Informações relativas à origem, local de recolha, estabelecimento de origem do produto, ou outras informações que possam pôr em causa a integridade da empresa ou dos seus clientes, não serão divulgadas nesta dissertação.

As análises laboratoriais químicas e microbiológicas, deste trabalho, foram, respectivamente, realizadas no Laboratório de Química e no Laboratório de Microbiologia da empresa SGS. Para o presente estudo foram escolhidas como matrizes alimentares, a carne fresca de vaca e a carne fresca de porco.

### 4.1 Obtenção das amostras

As amostras utilizadas na realização deste estudo foram colhidas por profissionais da empresa SGS, nos respetivos estabelecimentos e recebidas durante o período de estágio, na sala de receção de amostras da empresa. Estas amostras foram posteriormente selecionadas aleatoriamente e de seguida subdivididas em condições de assepsia e conservadas, em sacos esterilizados corretamente fechados, nos respetivos frigoríficos, a 5°C e a 10°C. Para as mesmas foram pedidas análises químicas, que incluíam a análise de NaCl, pH e de  $a_w$ , ainda foram realizadas análises microbiológicas, que incluíam a contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* e microrganismos totais a 30°C e a pesquisa de *Salmonella* spp. Todas as análises laboratoriais realizadas às amostras foram efetuadas nas condições originais das mesmas, isto é, logo após a sua receção no laboratório e sem qualquer tipo de alteração. Para uma investigação composta, selecionaram-se aleatoriamente, 20 amostras de carne de vaca e posteriormente 20 amostras de carne de porco. Para cada amostra foi associado um código, em forma de código de barras, por forma a cumprir os objetivos de controlo da empresa e para permitir que a amostra fosse reconhecida no equipamento de análise automático KITTY.

## 4.2 Preparação de meios de cultura

### 4.2.1.BPW (Buffered peptone water/ Água peptonada tamponada) (Bio-Rad®)

A água peptonada utilizada, na preparação das diluições das amostras, tinha a seguinte composição por litro:

- Peptona de caseína e de gelatina (tecido animal) - 10,0 g
- Cloreto de sódio - 5,0 g
- Di-sódio hidrogenofosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) - 9,0 g
- Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 1,5 g

Para a preparação de 1000 mL, de água peptonada, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 20,0g de meio desidratado (BPW®), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$

### 4.2.2.½ Fraser com suplemento ½ Fraser (Bio-Rad®)

O meio ½ Fraser (Bio-Rad®) tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona de caseína e de gelatina (tecido animal) - 5,0 g
- Extrato de carne – 5,0 g
- Extrato de levedura - 5,0 g
- Cloreto de sódio - 5,0 g
- Di-sódio hidrogenofosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) - 12,0 g
- Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 1,35 g
- Esculina - 1,0 g

Para a preparação de 1000 mL do meio ½ Fraser, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 55,0g do meio desidratado (½ Fraser-Bio-Rad®) para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frasco, 10 mL do suplemento (½ Fraser-Bio-Rad®) e de seguida colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . O suplemento ½ Fraser- Bio-Rad® contém 5,0 g de citrato de ferro e amónia, cloreto de acriflavina e ácido nalidixico e preparou-se através da adição, em condições de assepsia, de 100 mL água destilada estéril ao próprio frasco que continha o suplemento ½ Fraser desidratado.

O meio ½ Fraser com suplemento é utilizado como meio de enriquecimento para a detecção de *Listeria* em matrizes alimentares. Este meio é bastante nutritivo e possui esculina que quando hidrolizada pela  $\beta$ -glucosidase dá origem ao escurecimento do meio. O crescimento das bactérias acompanhantes é fortemente inibido pela presença de cloreto de acriflavina e de ácido nalidixico (Himedia, 2014).

#### **4.2.3.TBX (Tryptone-bile X-glucuronic/ triptona-bilís X-glucurónico) (Bio-Rad®)**

O meio TBX é um meio cromogénico seletivo para *E. coli*. Este meio possui sais biliares para inibir o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e 5-bromo-4-cloro-indolil-  $\beta$ -D-ácido glucorónico, que quando hidrolizado pela enzima glucuronidase origina um composto azul. A maioria das estirpes de *E. coli* pode diferenciar-se dos restantes coliformes por ter atividade da enzima glucuronidase. Assim, quando a *E. coli* cresce neste meio origina o aparecimento de colónias azuis.

O meio TBX (Bio-Rad®) tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona de caseína - 20,0 g
- Sais biliares - 5,0 g
- 5-Bromo-4-cloro-indolil-  $\beta$ -D-ácido glucorónico - 144  $\mu$ mol
- Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) -1,5 g
- Dimetil sulfóxido - 3 mL
- Agar – 9,0 a 18,0 g

Para a preparação de 1000 mL do meio TBX, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 33,6g de meio desidratado (TBX -Bio-Rad®), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida foi levado à placa de aquecimento, em constante agitação, até o agar se dissolver, após ser retirado da placa, foi transferido para um frasco, com capacidade volumétrica de 1000 mL e posteriormente efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  (Oxoid, 2014a).

#### **4.2.4 BPM (Baird Parker Medium) (Bio-Rad®) com suplemento gema de ovo telurite (Egg Yolk Tellurite/ Gema de ovo telurite- Oxoid®) e RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen/ Plasma Fibrinogénio de Coelho) (Bio-Rad®)**

O suplemento gema de ovo telurite tem a seguinte composição por 1000 mL

- Gema de ovo de galinha e ovo -100%
- Telurite de potássio – 6 mL

O suplemento RPF tem a seguinte composição por 1000 mL

- Plasma de coelho – 2,5 mL
- Fibrinogénio de bovino – 0,5g
- Inibidores da tripsina – 2,5g
- Telurito de potássio – 2,5g

Para a preparação do suplemento adicionou-se, em condições de assépsia, ao frasco do próprio suplemento (RPF-Bio-Rad®) desidratado, 50 mL de água destilada estéril.

O meio BPM (Bio-Rad®) tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona de caseína hidrolisada - 10,0g
- Extrato de carne – 5,0g
- Extrato de levedura – 1,0g
- Glicina – 12,0g
- Piruvato de sódio - 10,0g
- Cloreto de lítio – 5,0 g
- Agar – 20,0 g
- Emulsão de gema de ovo

Para a preparação de 1000 mL do meio BPM, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 57,0g de meio desidratado (BPM-Bio-Rad®), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida foi levado à placa de aquecimento, em constante agitação, até o agar se dissolver, após ser retirado da placa, foi transferido para um frasco, com capacidade volumétrica de 1000 mL e posteriormente efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frasco, 50 mL do suplemento gema de ovo telurite (Gema de ovo telurite- Oxoid®) e 100 mL do suplemento RPF (RPF- Bio-Rad®) e agitou-se, de seguida colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



O meio de Baird-Parker é seletivo para *S. aureus*. O telurito inibe a maioria dos coliformes e é reduzido pelo *S. aureus* originando colônias pretas. A presença da gema de ovo permite verificar a atividade da lecitinase, originando zonas claras em redor das colônias. A presença do plasma de coelho permite verificar a atividade de coagulase. Assim o crescimento de *S. aureus* no meio BPM com RPF origina o aparecimento de colônias pretas redeadas por uma zona de precipitação, que demonstra a atividade de coagulase (Cruinn Diagnostics Ltd., 2014).

#### **4.2.5. PCA (Plate Count Agar) (Bio-Rad®)**

O meio PCA tem a seguinte composição por 1000 mL

- Peptona de caseína - 5,0g
- Extrato de levedura – 2,5g
- Glucose anidra – 1,0g
- Agar – 9,0 g a 18,0 g

Para a preparação de 1000 mL do meio PCA, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 41,0g de meio desidratado (PCA-Bio-Rad®), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida levou-se à placa de aquecimento, em constante agitação, até o agar se dissolver e posteriormente efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.6.AL (Agar Listeria) (Bio-Rad®)

O meio AL tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona de caseína (tecido animal) - 18,0g
- Triptona – 6,0g
- Extrato de levedura – 10,0g
- Piruvato de sódio - 2,0g
- Glucose – 2,0g
- Magnésio glicerofosfato - 1,0g
- Sulfato de magnésio anidro - 0,5g
- Cloreto sódio - 5,0g
- L-  $\alpha$ -fosfatidil-inositol – 2,0g
- Hidrogenofosfato dissódico anidro
- Cloreto de lítio – 10,0g
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo – 0,05g
- Ácido nalidíxico – 0,02g
- Ceftazidima – 0,02
- Polimixina B - 76700 IU
- Ciclohexamida – 0,05g
- Agar – 12,0g

Para a preparação de 1000 mL, do meio AL, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 73,5g de meio desidratado (AL-Bio-Rad®), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água destilada; de seguida foi levado à placa de aquecimento, em constante agitação, até o agar se dissolver, após ser retirado do aquecimento, foi transferido para um frasco, com capacidade volumétrica de 1000 mL e posteriormente efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O meio AL é específico para a deteção de *Listeria* uma vez que permite detetar simultaneamente duas atividades enzimáticas: a  $\beta$ -glucosidase e a fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC). A atividade  $\beta$ -D-glucosidase é comum ao género *Listeria* e traduz-se na formação de colónias azuis esverdeadas como resultado da hidrólise do 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-

glucopiranosídeo. A atividade PI-PLC está presente apenas nas espécies patogénicas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Devido a esta atividade enzimática estas espécies metabolizam o L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol o que origina a formação de um halo opaco à volta das suas colónias (Bio-Rad, 2014a).

#### **4.2.7.RLM (Rapid L'Mono) (Bio-Rad®)**

O meio RLM tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona - 30,0g
- Extrato de carne – 5,0g
- Extrato de levedura – 1,0g
- Cloreto de lítio – 9,0g
- Xilose – 10g
- Vermelho de fenol – 0,12g
- Agar – 13g
- Solução cromogénica – 1mL
- Solução seletiva – 20mL

Para a preparação de 1000 mL, do meio RLM, pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 68,12g de meio desidratado (RLM-Bio-Rad®), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água esterilizada; de seguida foi levado à placa de aquecimento, até ferver; após arrefecimento, foi transferido para placas de Petri, que posteriormente se colocaram no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O meio RLM é um meio cromogénico que permite a deteção da atividade da enzima fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC), característica das espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, através da formação de colónias azuis. Assim, enquanto que a maioria das espécies de *Listeria* ao crescerem neste meio originam colónias brancas, estas duas espécies originam colónias azuis. Por outro lado, das espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* apenas a *L. ivanovii* consegue metabolizar a xilose, o que origina o aparecimento de um halo amarelo à volta das colónias que está ausente nas colónias de *L. monocytogenes*. A solução seletiva inibe o crescimento da flora interferente sendo eficaz contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (Bio-Rad 2014b).

#### 4.2.8.RV (Rappaport Vassiliadis) (Merck ®)

O meio RV tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Peptona de farelo - 4,5g
- Cloretodihexohidratado de magnésio – 28,6g
- Cloreto de sódio – 7,2 g
- Fosfato dipotássico hidrogenado – 0,18g
- Verde de malaquite – 0,036g

Para a preparação de 1000 mL do meio RV pesou-se, na balança analítica (Mettler PM) 41,8g de meio desidratado (RV-Merck®), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL, e adicionou-se 1000 mL de água destilada; após completa dissolução o meio foi distribuído por tubos; efetuando-se, posteriormente, a sua esterilização através da colocação dos tubos, no respetivo suporte, na autoclave (Uniclave 88), a uma temperatura de 115°C, durante 15 minutos. Por último, após o arrefecimento, colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O meio Rappaport-Vassiliadis (RV) é um meio de enriquecimento para a deteção de *Salmonella*. A formulação deste meio tira partido de quatro características desta bactéria: A sua resistência a pressões osmóticas relativamente elevadas; a sua capacidade de se multiplicar a valores de pH relativamente baixos; a sua resistência ao verde de malaquite; e à sua pouca exigência nutricional (Oxoid, 2014b)

### 4.3 Métodos de enumeração e determinação dos microrganismos

Os métodos mencionados nos pontos 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5 possuem um procedimento estruturado pelas normas ISO respetivas, no entanto, por opção do laboratório de microbiologia, foram realizadas algumas alterações. Para todos os métodos foram realizadas placas em duplicado. O equipamento Kitty efetua a técnica de incorporação, em todos os métodos que deste dependeram. Na preparação das suspensões iniciais, foram retiradas amostras representativas, isto é, de várias zonas diferentes de cada peça de carne em análise.

#### 4.3.1-Método Horizontal de Enumeração de *Escherichia coli* de acordo com a ISO 16649-1 de 2001

Para a enumeração de *E. coli*, pesaram-se 10 g de amostra na balança analítica (Mettler PM) para um saco de *Stomacher* e homogeneizou-se em 90 mL de água peptonada, por agitação contínua no agitador *Stomacher* (Laboratory Blender, *Stomacher*), durante 30 segundos, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ ; realizou-se mais uma diluição ( $10^{-2}$ ), com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo) e respetivas pontas estéreis, passou-se 1 mL da diluição  $10^{-1}$ , para um tubo com 9 mL de água peptonada, obtendo a diluição  $10^{-2}$ ; transferiram-se os tubos, com as respetivas diluições,

para um equipamento (KITTY), visível na figura 8.1 em anexo, que procedeu à inoculação de 1mL de solução de amostra, de cada diluição, em placas de Petri, de seguida procedeu ao seu preenchimento com o meio TBX (Bio-Rad ®) e efetuou a mistura por rotação mecânica das placas; retiraram-se as placas já finalizadas, do respetivo equipamento (KITTY), visível na figura 8.2 em anexo e incubou-se, de forma invertida, na estufa (Binder) a  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h. Após a incubação procedeu-se à contagem das colónias típicas formadas, ou seja, de UFC de *E.coli*,  $\beta$ -glucoronidase-positivas de cor azul, como visível na figura 8.5 em anexo. As contagens foram efetuadas nas placas que continham menos de 150 UFC típicas de *E. coli* e menos de 300 UFC típicas e não típicas no total das duas placas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), tendo as placas que não apresentavam nenhuma colónia típica (0 UFC), sido igualmente consideradas nos cálculos.

#### **4.3.2- Método Horizontal de Enumeração de *Staphylococcus aureus* de acordo com a ISO 6888-2 de 1999.**

Para a enumeração de *S. aureus* pesaram-se 10 g de amostra na balança analítica (Mettler PM) para um saco de *Stomacher* e homogeneizou-se em 90 mL de água peptonada, por agitação contínua no agitador *Stomacher* (Laboratory Blender, *Stomacher*), durante 30 segundos, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ ; realizou-se mais uma diluição ( $10^{-2}$ ), com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo) e respetivas pontas estéreis, passou-se 1 mL da diluição  $10^{-1}$ , para um tubo com 9 mL de água peptonada, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ ; transferiu-se, com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo) 1mL de cada diluição, para 2 placas de Petri correspondentes, como visível na figura 8.3 em anexo, colocou-se imediatamente, o meio de cultura BPM já suplementado com RPF, até perfazer aproximadamente os 3mm de profundidade e misturou-se cuidadosamente. Após a secagem, incubaram-se as placas, de forma invertida, na estufa (Mettmert) a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 48 h. Após a incubação, procedeu-se à contagem das colónias típicas formadas, ou seja de UFC de *S.aureus*, coagulase-positivas, caracterizadas por serem pequenas de cor preta ou cinzenta e rodeadas por um halo esbranquiçado, como visível na figura 8.6 em anexo; efetuou-se a contagem, para cada placa, contendo menos de 150 UFC típicas e menos de 300 UFC típicas e não típicas no total das duas placas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), tendo as placas que não apresentavam nenhuma colónia típica (0 UFC), sido igualmente consideradas nos cálculos.

#### **4.3.3- Método Horizontal de Enumeração de *Listeria monocytogenes* de acordo com a ISO 11290-2 de 1998 e respetiva retificação 1 de 2004**

Para a enumeração de *L. monocytogenes*, pesaram-se 10 g de amostra, na balança analítica (Mettler PM), para um saco de *Stomacher* e homogeneizou-se, em 90 mL de  $\frac{1}{2}$  Fraser, por agitação contínua no agitador *Stomacher* (Laboratory Blender, *Stomacher*), durante 30 segundos, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  e, de seguida, incubou-se, por uma hora, na estufa (Mettmert) a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após este período, realizou-se outra diluição ( $10^{-2}$ ), com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo) e respetivas pontas estéreis. Assim, passou-se 1mL da diluição  $10^{-1}$ , para um tubo com 9 mL de  $\frac{1}{2}$  Fraser, formando assim, a diluição  $10^{-2}$ . Transferiram-se os 2 tubos, para um

equipamento (KITTY) que procedeu à inoculação de 1mL de solução de amostra, de cada diluição, em placas de Petri, procedendo ao preenchimento das placas com o meio AL (Bio-Rad ®) e à mistura por rotação mecânica das placas. No final, retiraram-se as placas já secas do equipamento, tendo estas sido invertidas e incubadas na estufa (Memmert) a  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ , durante 24h. Após a incubação, efetuou-se a contagem, em cada placa, de colónias típicas formadas, ou seja, de UFC de *L.monocytogenes*, características pela sua cor azul esverdeada e rodeadas por um halo esbranquiçado e opaco, como apresentado na figura 8.7 em anexo. Foram contadas as placas contendo menos de 150 UFC típicas e menos de 300 UFC típicas e não típicas no total das duas placas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), tendo as placas em que se obtiveram 0 UFC também sido consideradas nos cálculos apresentados posteriormente. Dessas colónias características, selecionou-se uma amostra significativa e procedeu-se, com a ajuda de uma ansa descartável estéril, ao seu espalhamento na superfície de uma placa de Petri com meio RLM (Bio-Rad ®) e incubou-se na estufa (Memmert) a  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ , durante 24h. Finda a incubação, avaliou-se se o resultado foi positivo, ou seja, se na placa com meio RLM houve formação de colónias azuis escuras sem halo amarelado, que confirmassem de fato a presença de *L.monocytogenes*, como explícito na figura 8.8 em anexo.

#### **4.3.4- Método Horizontal de Detecção de *Salmonella* spp. de acordo com a ISO 6579 e respetiva retificação 1 de 2007.**

Para a deteção de salmonella, pesaram-se 10 g de amostra, na balança analítica (Mettler PM), para um saco de *Stomacher* e homogeneizou-se, em 90 mL de água peptonada, por agitação contínua no agitador *Stomacher* (Laboratory Blender, *Stomacher*), durante 30 segundos, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Esta diluição foi incubada na estufa (Memmert) a  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ , durante 24h. Findo este tempo inoculou-se, a partir da solução  $10^{-1}$  do saco de *Stomacher*, com a ajuda de uma ansa descartável estéril, um tubo de vidro contendo meio Rappaport Vassiliadis (Merck ®), misturou-se cuidadosamente e incubou-se na estufa (Binder) a  $42\pm1^{\circ}\text{C}$ , durante 24h. Quando, no final desta incubação, os tubos não apresentavam uma turbidez completa do meio e a existência, na sua superfície, de uma auréola branca com borda claramente definida, sinais de resultado positivo, apresentando-se com as suas características originais, isto é, cor azul esverdeada e transparência, a incubação foi prolongada por mais 24 horas nas mesmas condições.

#### **4.3.5 Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Totais a $30^{\circ}\text{C}$ , segundo a ISO 4833 de 2003.**

Para a enumeração de microrganismos totais a  $30^{\circ}\text{C}$ , pesaram-se 10 g de amostra, na balança analítica (Mettler PM), para um saco de *Stomacher* e homogeneizou-se em 90 mL de água peptonada, por agitação contínua no agitador *Stomacher* (Laboratory Blender, *Stomacher*), durante 30 segundos, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ ; realizaram-se mais três diluições, com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo) e respetivas pontas estéreis, passou-se 1 mL da diluição  $10^{-1}$ ,

para um tubo com 9 mL de água peptonada, formando, desta forma, a diluição  $10^{-2}$  e passou-se 1 mL da diluição  $10^{-2}$ , para um tubo com 9 mL de BPW, obtendo-se a diluição  $10^{-3}$ , operou-se, desta forma, mais uma vez e obteve-se a diluição  $10^{-4}$ ; obtendo-se 4 tubos com 4 diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ), que foram transportados para um equipamento (KITTY) que procedeu à inoculação de 1 mL de solução de amostra, de cada diluição, em placas de Petri e de seguida procedeu ao seu preenchimento com o meio PCA (Bio-Rad ®) e efetuou a mistura por rotação mecânica das placas. No final retiraram-se as placas já finalizadas do respetivo equipamento (KITTY) e incubou-se, de forma invertida na estufa (Binder)  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 72 horas. Procedeu-se então à contagem de todas as colónias formadas, com uma lupa magnificadora, como visível na figura 8.4 em anexo, em cada placa ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) contendo mais de 15 e menos de 300 colónias.

#### 4.4-Cálculos

Para os métodos, acima mencionados, nomeadamente nos pontos 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.5, o número de UFC do respetivo microrganismo presente na amostra e expresso em UFC/g, foi calculado com base na média ponderada de duas diluições sucessivas, utilizando a seguinte equação:

$$N = \frac{\Sigma a}{V(n1 + 0,1 n2)d}$$

Em que:

$\Sigma a$  - É o somatório de UFC contadas em todas as placas retidas, de duas diluições sucessivas

$n1$  - É o número de placas retidas, na primeira diluição

$V$  - É o volume de inóculo, em mililitros, aplicado a cada placa

$n2$  - É o numero de placas retidas, da segunda diluição

$d$  - É o fator de diluição correspondente à primeira diluição retida

#### 4.5-Delineamento Experimental

Para a execução desta investigação, foram efetuadas análises microbiológicas em laboratório, nomeadamente pesquisa de *Salmonella* e contagem de *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *E.coli* e contagem de microrganismos totais a  $30^\circ\text{C}$  a 20 amostras de carne de vaca e 20 amostras de carne de porco. Cada amostra foi analisada no momento de chegada ao laboratório (T0), tendo depois sido dividida em duas sub-amostras: uma que se conservou a  $5^\circ\text{C}$  e outra que se conservou a  $10^\circ\text{C}$ . As amostras assim conservadas, foram analisadas de dois em dois dias ao longo de seis dias, ou seja, as amostras foram analisadas ao fim de 48 (T2), 96 (T4) e 144 (T6) horas de conservação a cada uma das temperaturas. As amostras conservadas a  $5^\circ\text{C}$  foram sujeitas a análise microbiológica completa apesar de, a esta temperatura, só ser possível efectuar previsões para o crescimento de *L.monocytogenes* através das ferramentas preditivas devido às limitações

dos *softwares*. Contudo, a realização das análises a esta temperatura foi efectuada de modo a permitir uma comparação entre os resultados obtidos a 10°C e os resultados obtidos á temperatura normal de conservação.

As amostras foram codificadas consoante o tipo de carne, em que a letra A representa a carne de vaca e a letra B a carne de porco; consoante a temperatura de armazenamento, em que 5 representa a temperatura de 5°C e 10 a temperatura de 10°C, e finalmente com um número de 1 a 20 que numera as amostras, entre as 20 amostras de vaca e entre as 20 amostras de porco. Assim, por exemplo, o código A5.1 corresponde à amostra 1 das 20 amostras de carne de vaca, armazenada a 5°C e o código B10.1 corresponde à amostra 1 das 20 amostras de carne de porco, armazenada a 10 °C.

Os resultados obtidos nestas análises foram, sempre que possível, confrontados com as previsões obtidas através dos modelos preditivos.

#### 4.6-Aplicação dos Softwares Preditivos PMP e ComBase

Conforme anteriormente referido, as ferramentas preditivas possuem limites que condicionam a sua utilização. Nos quadros 4.1 e 4.2 apresentam-se as gamas possíveis de variação de alguns parâmetros físico-químicos que os modelos permitem para cada um dos microrganismos.

**Quadro 4.1**-Limites dos parâmetros físico-químicos para os diversos microrganismos no PMP (adaptado de ARS.USDA, 2014).

Pathogen Modeling Program			
Microrganismo	pH	NaCl (%)	Temperatura (°C)
<i>Salmonella</i>	-	-	10,0 – 45,0
<i>S.aureus</i>	4,5 – 9,0	0,5 – 12,5	10,0 – 42,0
<i>L.monocytogenes</i>	4,5 - 7,5	0,5 - 10,5	4,0 – 37,0
<i>E.coli</i>	-	-	-



**Quadro 4.2**-Limites dos parâmetros físico-químicos para os diversos microrganismos no ComBase (adaptado de ComBase, 2014).

ComBase Predictor				
Microrganismo	pH	a <sub>w</sub>	NaCl (%)	Temperatura (°C)
<i>Salmonella</i>	3,9 - 7,4	0,973 - 1	0,0 - 4,6	7 – 40,0
<i>S.aureus</i>	4,4 - 7,1	0,907 - 1	0,0 - 13,5	7,5 – 30,0
<i>L.monocytogenes</i>	4,4 – 7,5	0,934 - 1	0,0 -10,2	1 - 40
<i>E.coli</i>	4,5 – 7,5	0,961 - 1	0,0 – 6,5	10,0 – 42,0

O PMP considera apenas a *E.coli* O157:H7, como tal, para este *software* não foi possível efetuar previsões para a *E.coli*. Para a *Salmonella*, o modelo baseia-se apenas na temperatura, para realizar a previsão, daí não serem apresentados, no quadro 4.1, valores limite de pH e NaCl. A observação dos quadros 4.1 e 4.2, permite verificar que, no caso do ComBase não é possível efetuar previsões para temperaturas inferiores a 7°C, exceto para a *L.monocytogenes* e, no caso do PMP, para valores inferiores a 10°C, com a mesma exceção.

Para todas as previsões efetuadas no ComBase, adotou-se o valor do estado fisiológico (phys. State) geral, recomendado pela própria ferramenta, para cada microrganismo, pelo fato de a análise deste parâmetro não ser comum e não ter sido efetuada em laboratório, tendo o valor de CO<sub>2</sub> sido considerado zero. Ainda nesta ferramenta, as previsões foram realizadas para condições de aerobiose.

Para todas as previsões realizadas no PMP e devido às limitações desta ferramenta, o valor adotado de NaCl, teve que ser igual ou superior a 0,50% e o valor inicial de contaminação, igual ou superior a 3 logUFC/g, sendo que, para estes parâmetros, foram sempre considerados os valores mínimos, quando aplicável. Ainda nesta ferramenta preditiva, o valor de nitrito de sódio, foi considerado zero e as previsões foram calculadas para condições de aerobiose.

Para ambos os *softwares*, apenas se utilizaram três fatores: pH, NaCl (%) e temperatura (°C), para obtenção de previsões, pelo fato de não ser possível efetuar análises e consequentemente obter resultados, para os fatores adicionais destas ferramentas, como o CO<sub>2</sub> (ComBase) e o Nitrito de Sódio (PMP).

Em todas as previsões, foi utilizado o valor de NaCl (%) preferencialmente ao de a<sub>w</sub>, pelo fato do PMP não utilizar este fator para efetuar as previsões e pelo fato do ComBase apenas aceitar valores acima de 0,907.



## RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados das análises às amostras de carne de vaca e de porco

Os valores de pH,  $a_w$  e NaCl de todas as amostras de carne de vaca e de porco, determinadas em T0, encontram-se nos quadros 8.1 e 8.2 em anexo. Igualmente em anexo, nos quadros 8.3 a 8.16, encontram-se os resultados detalhados das análises das 40 amostras de carne recolhidas, ao longo do tempo de incubação a 5 e a 10°C, para todos os microrganismos em estudo. De seguida apresentam-se apenas os resultados finais de contaminação, ao longo do tempo, para cada uma das temperaturas e apenas para as amostras de carne de vaca e de carne de porco que apresentaram resultados positivos (quadros 5.1 a 5.4).

**Quadro 0.1-Microrganismos aeróbios totais a 30°C (UFC/g) para as amostras de carne de vaca.**

	Conservação a 5°C					Conservação a 10°C			
	T0	T2	T4	T6		T0	T2	T4	T6
A5.1	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.1	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.2	4E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.2	4E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.3	3E+3	2,04E+6	>300E+4	>300E+4	A10.3	3E+3	2,16E+6	>300E+4	>300E+4
A5.4	6E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.4	6E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.5	3E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.5	3E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.6	6E+2	2,76E+6	>300E+4	>300E+4	A10.6	6E+2	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.7	3E+2	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.7	3E+2	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.8	7E+3	2,38E+6	>300E+4	>300E+4	A10.8	7E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.9	7E+3	8E+3	>300E+4	>300E+4	A10.9	7E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.10	5E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.10	5E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.11	3E+3	1,48E+6	>300E+4	>300E+4	A10.11	3E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.12	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.12	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.13	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.13	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.14	9E+2	9E+2	>300E+4	>300E+4	A10.14	9E+2	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.15	7E+3	1,69E+5	>300E+4	>300E+4	A10.15	7E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.16	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.16	2E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.17	5E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.17	5E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.18	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	A10.18	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.19	6E+3	1,68E+6	>300E+4	>300E+4	A10.19	6E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
A5.20	1E+4	2E+6	>300E+4	>300E+4	A10.20	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4

**Quadro 0.2-**Microorganismos aeróbios totais a 30°C (UFC/g) para as amostras de carne de porco.

	Conservação a 5°C					Conservação a 10°C			
	T0	T2	T4	T6		T0	T2	T4	T6
<b>B5.1</b>	6E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.1</b>	6E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.2</b>	3E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.2</b>	3E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.3</b>	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.3</b>	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.4</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.4</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.5</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.5</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.6</b>	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.6</b>	1E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.7</b>	3E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.7</b>	3E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.8</b>	2E+6	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.8</b>	2E+6	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.9</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.9</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.10</b>	1E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.10</b>	1E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.11</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.11</b>	>300E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.12</b>	3E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.12</b>	3E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.13</b>	5E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.13</b>	5E+3	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.14</b>	2E+6	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.14</b>	2E+6	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.15</b>	1E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.15</b>	1E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.16</b>	6E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.16</b>	6E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.17</b>	3E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.17</b>	3E+4	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.18</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.18</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.19</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.19</b>	6E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4
<b>B5.20</b>	3E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4	<b>B10.20</b>	3E+5	>300E+4	>300E+4	>300E+4

**Quadro 0.3-**Amostras de carne de vaca com resultados positivos para *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*.

	<i>E. coli</i> (UFC/g)					<i>S. aureus</i> (UFC/g)			
	T0	T2	T4	T6		T0	T2	T4	T6
A 10.1	<5	<5	7E+1	9E+1	A 10.12	<5	<5	<5	1E+1
A10.11	<5	<5	7E+1	8E+1	A 10.13	<5	<5	<5	7E+1
A10.13	<5	<5	<5	2E+1					
A10.15	<5	1E+1	1,45E+2	4E+3					
A 10.16	<5	1,15E+3	1,32E+3	4E+3					

**Quadro 0.4-** Amostras de carne de porco com resultados positivos para *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*.

	<i>E. coli</i> (UFC/g)					<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)			
	T0	T2	T4	T6		T0	T2	T4	T6
<b>B5.3</b>	<10	1E+1	3E+1	-	<b>B5.8</b>	<5	<5	2E+2	3E+2
<b>B10.3</b>	<10	4E+1	5E+1	3E+2	<b>B10.8</b>	<5	<5	3E+2	6E+2
<b>B10.4</b>	<10	<10	6E+1	9E+2	<b>B5.10</b>	<5	<5	<5	1E+2
<b>B10.6</b>	<10	2E+1	6E+1	7E+1	<b>B10.10</b>	<5	6E+2	9E+2	2E+3
<b>B10.7</b>	<10	<5	7E+1	8E+1	<b>B10.13</b>	<5	3E+3	>150E+2	>150E+2
<b>B5.10</b>	<10	<5	2E+1	1E+2	<b>B5.18</b>	<5	<5	<5	1E+1
<b>B10.10</b>	<10	<5	7E+2	9E+2	<b>B10.18</b>	<5	<5	3E+1	4E+2
<b>B10.15</b>	<10	<5	3E+2	4E+2	<b>B10.19</b>	<5	<5	<5	2E+1
<b>B5.16</b>	<10	<5	1E+2	2E+2	<b>B10.20</b>	<5	1E+2	2E+2	4E+2
<b>B10.16</b>	<10	<5	2E+2	4E+2					
<b>B10.19</b>	<10	<5	3E+1	6E+1					
<b>B10.20</b>	<10	<5	3E+3	>150E+2					

-) Não determinado.

As contagens iniciais (T0) de microrganismos aeróbios totais a 30°C (quadros 5.1 e 5.2) mostram, na generalidade, um grau de contaminação mais elevado nas amostras de carne de porco. Com efeito, enquanto que nas amostras de carne de vaca apenas se verificou um caso (5%) em que as contagens excederam os 3E+6 UFC/g, no caso da carne de porco, esse valor foi ultrapassado em 3 amostras (15%), tendo outras 4 amostras obtido contagens entre 5E+5 e 3E+6. Segundo o Regulamento 1441/2007, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, a contagem de colónias aeróbias a 30°C, para a carne separada mecanicamente, no fim do processo de produção não pode ser superior a 5E+6 UFC/g, podendo apenas duas unidades de um total de cinco que constituem a amostra apresentar valores entre 5E+5 e 5E+6 UFC/g. Segundo o mesmo regulamento as medidas a aplicar no caso de se obterem, nesta análise, resultados insatisfatórios são a melhoria das condições de higiene na produção e a melhoria da selecção e/ou origem das matérias-primas.

Comparando o crescimento a 5 e a 10°C é possível verificar, no caso da carne de vaca, um maior desenvolvimento microbiano do T0 para o T2 quando a amostra foi conservada a 10°C do que quando foi conservada a 5°C. No caso dos restantes tempos de armazenamento, para as amostras de carne de vaca, e para todos os tempos de conservação, para as amostras de carne de porco, essa diferença não foi visível uma vez que não se conseguiu determinar o valor exato de contaminação devido ao elevado número de colónias obtido na maior das diluições.

A carne constitui um meio rico em nutrientes, com valores de  $a_w$  e pH dentro da gama de crescimento da maioria dos microrganismos, sendo, deste modo, um alimento facilmente contaminado. Os microrganismos que se encontram nas carnes de vaca e de porco, normalmente,

refletem o ambiente da zona de abate e processamento das carnes, com predominância para as bactérias gram-negativas, nomeadamente dos géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Moraxella*. Dentro das bactérias gram-positivas os *Enterococcus* e os *Lactobacillus* constituem os géneros predominantes (Jay *et al.*, 2005).

Da observação dos quadros 5.3 e 5.4 é possível verificar que nenhuma das amostras de carne de vaca ou de porco apresentou contaminação com *Salmonella*, que em nenhuma das amostras de carne de vaca se identificou a presença de *L. monocytogenes* e que em nenhuma das amostras de carne de porco se verificou a presença de *S. aureus*.

A pesquisa de *Salmonella* foi negativa em todas as amostras analisadas. Com efeito, nunca se verificou crescimento nos tubos com meio RVS (Merck®) nem ao fim de 24 horas, nem ao fim de 48 horas de incubação na estufa (Binder) a  $42\pm1^{\circ}\text{C}$ . A pesquisa de *Salmonella* só foi efetuada no T0, uma vez que os resultados foram sempre negativos, não se justificando, portanto, a realização da análise em tempos posteriores. Desta forma, conclui-se que os resultados, para as 40 amostras, foram negativos, o que equivale a dizer que a *Salmonella* foi negativa em 10g.

Em relação à carne de vaca, foi possível verificar a presença de *E. coli* em 5 amostras (25%) conservadas a  $10^{\circ}\text{C}$ , sendo que essa presença foi identificada ao fim de dois dias de conservação (amostras A10.15 e A10.16) ao fim de quatro dias de conservação (amostras A10.1 e A10.11) e ao fim de seis dias (amostra A10.13). Já em relação à carne de porco a *E. coli* foi detectada num número mais elevado de amostras, durante a conservação a  $5^{\circ}\text{C}$  (amostras B5.3, B5.10 e B5.16), e, principalmente, durante a conservação a  $10^{\circ}\text{C}$  (amostras B10.3, B10.4, B10.6, B10.7, B10.10, B10.15, B10.16, B10.19 e B10.20). Em algumas destas amostras foi possível quantificar a *E. coli* logo após os dois dias de conservação a  $5$  ou a  $10^{\circ}\text{C}$  (amostras B5.3, B10.3 e B10.6), enquanto que, para as restantes, essa deteção só foi possível ao fim de quatro dias de conservação.

Segundo o Regulamento 1441/2007, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, a contagem de *E. coli* para a carne separada mecanicamente no fim do processo de produção não pode ser superior a 500 UFC/g, podendo apenas duas unidades de um total de cinco que constituem a amostra apresentar valores entre 50 e 500 UFC/g. Nas análises iniciais (T0) a *E. coli* não foi detetada em nenhuma das amostras de carne de vaca ou de porco. Esta bactéria só foi sendo identificada e quantificada durante o período de conservação, altura em que as contagens de *E. coli* chegaram a ultrapassar o máximo de 500 UFC/g para algumas das amostras. Tal como, já referido para o caso dos microrganismos aeróbios a  $30^{\circ}\text{C}$ , também neste caso, o Regulamento 1441/2007 refere que as medidas a aplicar no caso de se obterem, nesta análise, resultados insatisfatórios são a melhoria das condições de higiene na produção e a melhoria da selecção e/ou origem das matérias-primas.

A presença de *S. aureus* foi identificada em apenas duas das amostras de carne de vaca não tendo sido identificada em nenhuma das amostras de carne de porco. Esta bactéria só se detectou ao fim dos seis dias de armazenamento a  $10^{\circ}\text{C}$  (amostras A10.12 e A10.13). No caso da *L. monocytogenes*, apenas se verificaram resultados positivos em seis amostras de carne de porco,

após conservação de 2, 4 ou 6 dias a 5 ou a 10°C. Esta contaminação é particularmente grave nos casos em que a carne seja consumida mal passada e, em especial, para os grupos de risco (grávidas, crianças e idosos).

Para todos os microrganismos analisados foi possível verificar uma diferença acentuada no crescimento dos microrganismos quando a conservação se processou a 5 ou a 10°C. Assim verificou-se um crescimento mais expressivo nas amostras incubadas a 10°C.

## **5.2. Aplicação das ferramentas preditivas para previsão do crescimento dos microrganismos nas amostras de carne de vaca**

Conforme anteriormente referido, utilizaram-se duas ferramentas preditivas o *software* ComBase e o *software* PMP. Nestas duas ferramentas preditivas o tempo é definido em horas, desta forma, a discussão de resultados será efetuada abordando os tempos (T0,T2,T4,T6) e as horas (0, 48, 96, 144).

Uma vez que não se detectou *Salmonella* nem *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras de carne de vaca analisadas não foram efetuadas previsões para estes microrganismos nestas amostras. Por limitações dos *softwares* e devido aos resultados obtidos, apenas foi possível efetuar previsões para o crescimento de *E. coli* e *S.aureus* à temperatura de 10°C. Assim, no que diz respeito a este tipo de carne, apenas se realizaram previsões para o crescimento de *E. coli* e de *S. aureus* a 10°C, através do *software* ComBase e de *S. aureus* a 10°C através do *software* PMP e apenas para as amostras em que foram obtidos resultados positivos. Desta forma, não foram utilizadas nesta análise as amostras de carne de vaca com os números 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 17, 18, 19 e 20.

Os resultados reais e os resultados das previsões dos *softwares*, apresentados no subcapítulo 5.2 e 5.3, serão apresentados em logUFC/g de forma a observar de forma mais clara o desvio entre os mesmos.

O quadro 5.5 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.1.

**Quadro 0.5**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.1 conservada a 5°C (A5.1) e a 10°C (A10.1).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.1				A10.1			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>							1,85	1,95
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,30	>6,48	>6,48	>6,48	3,30	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,870			6,32			0,101		

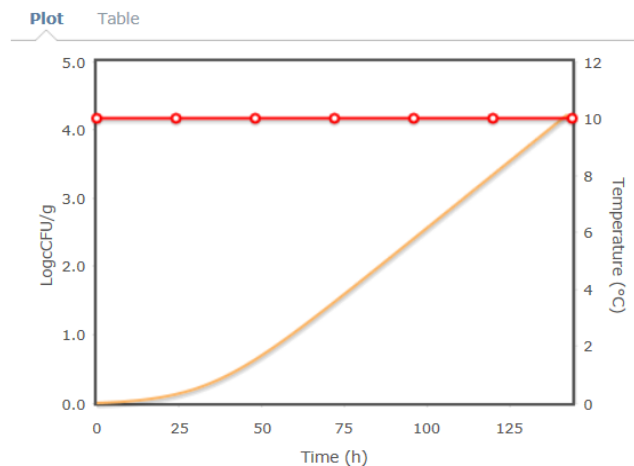
\*negativo em 10g. Campos preenchidos a cinza correspondem a amostras que não apresentaram resultados positivos (<5UFC/g).

O quadro 5.5 mostra que houve crescimento de *E. coli*, detetado a partir das 96 horas quando a amostra foi conservada a 10°C (A10.1) e ainda que houve um crescimento expressivamente elevado de microrganismos totais a 30°C, a partir de T2 quando a amostra foi conservada a 5 ou a 10°C. Os resultados da previsão do crescimento de *E. coli* nesta amostra, obtidos através do ComBase, encontram-se no quadro 5.6 e na figura 5.1.

**Quadro 0.6**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra A10.1, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,13
	48	0,64
	72	1,48
	96	2,41
	120	3,34
	144	4,28





**Figura 0.1-**Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra A10.1, durante 144 horas, representando a linha vermelha a temperatura de 10°C.

Como é visível, comparando os quadros 5.5 e 5.6, os valores obtidos, na contagem de *E. coli*, durante a análise laboratorial, não são idênticos aos valores obtidos na previsão do ComBase. Pela análise laboratorial, a manifestação de células de *E.coli* ocorre às 96 horas enquanto a ferramenta preditiva indica detecção de UFC/g em número superior a 5 UFC/g a partir das 72 horas. Contudo esta diferença pode não indicar nenhum desfasamento entre a previsão e a realidade, uma vez que não foi efetuada análise laboratorial as 72 horas. Às 96 horas, o quadro 5.5 e o 5.6 apresentam, respectivamente, os valores 1,85 e 2,41 logUFC/g; já às 144 horas, o quadro 5.5 demonstra o valor de 1,95 enquanto o 5.6, mostra 4,28 logUFC/g, o que representa uma divergência acentuada entre os respetivos valores. Desta forma, é perceptível que os resultados obtidos na previsão do ComBase foram mais elevados do que os auferidos na análise laboratorial. A diferença entre os valores resultantes do ComBase e da análise laboratorial, foi aumentando com o decorrer do tempo.

O quadro 5.7 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.11. Nesta amostra detetou-se o desenvolvimento de *E. coli* a partir das 96 horas quando a amostra foi conservada a 10°C (A10.11), bem como, uma taxa de crescimento elevada, por parte dos microrganismos totais a 30°C, quando a amostra foi conservada a 5°C (A5.11) ou a 10°C (A10.11). Os resultados da previsão do crescimento de *E. coli* nesta amostra, obtidos através do ComBase, encontram-se no quadro 5.8 e na figura 5.2.

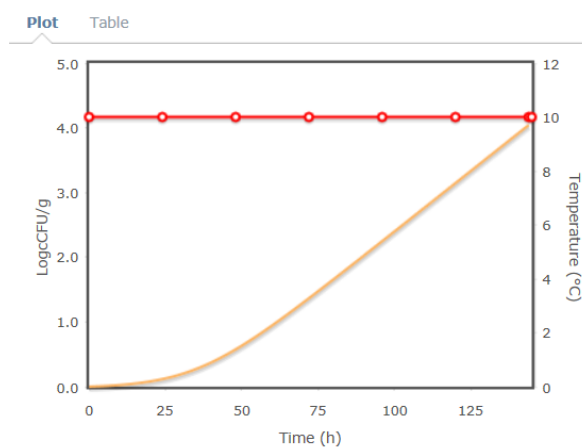
**Quadro 0.7-**Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.11 conservada a 5°C (A5.11) e a 10°C (A10.11).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.11				A10.11			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>							1,85	1,90
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,48	6,17	>6,48	>6,48	3,48	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,898			5,86			0,081		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.8-**Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra A10.11, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,12
	48	0,58
	72	1,37
	96	2,25
	120	3,15
	144	4,04



**Figura 0.2-**Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra A10.11, durante 144 horas.

Comparando os quadros 5.7 e 5.8, verifica-se que, no primeiro, há aparecimento de células de *E.coli* às 96 horas, enquanto que no segundo há detecção de unidades formadoras de colónias em número superior a 5 UFC/g a partir das 72 horas. Contudo, mais uma vez, esta diferença pode não indicar nenhum desfasamento entre a previsão e a realidade, uma vez que não foi efetuada nenhuma análise laboratorial às 72 horas. Às 96 horas, a análise em laboratório, apresenta um valor de 1,85 e a previsão exibe um valor de 2,25 logUFC/g; já às 144 horas, a diferença é mais acentuada, sendo de 2,14 logUFC/g, pois o quadro 5.7 exibe um valor de 1,90 e a quadro 5.8, apresenta um valor de 4,04 logUFC/g. Tal como verificado na amostra anterior, também com esta amostra, se verificou que a diferença obtida entre os dois métodos de análise, foi aumentando com o decorrer do tempo.

O quadro 5.9 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.12.

**Quadro 0.9**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.12 conservada a 5°C (A5.12) e a 10°C (A10.12).

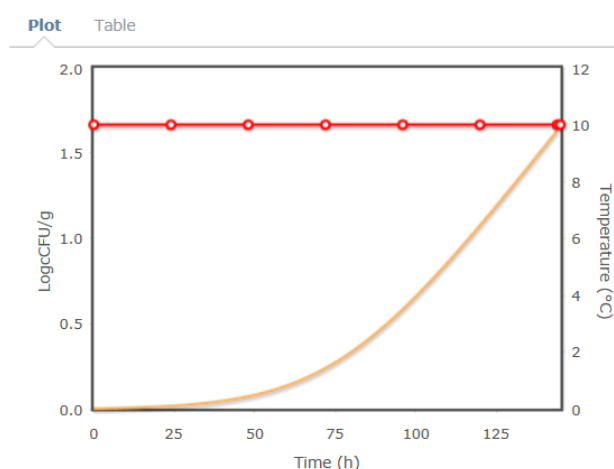
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.12				A10.12			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>								
<i>S. aureus</i>								1,00
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,30	>6,48	>6,48	>6,48	3,30	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,944			5,92			0,146		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

Analisando o quadro 5.9, verifica-se apenas o crescimento de *S. aureus*, detetado a partir das 144 horas, quando a amostra foi conservada a 10°C (A10.12) e o desenvolvimento expressivo de microrganismos totais a 30°C, quando a amostra foi conservada a 5°C (A5.12) ou a 10°C (A10.12). Os resultados da previsão do crescimento de *S. aureus* nesta amostra, obtidos através do ComBase, encontram-se no quadro 5.10 e na figura 5.3.

**Quadro 0.10**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *S. aureus*, na amostra A10.12, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,02
	48	0,07
	72	0,24
	96	0,58
	120	1,08
	144	1,63



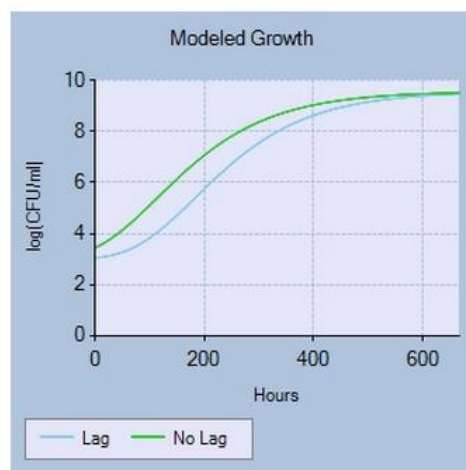
**Figura 0.3**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *S. aureus*, na amostra A10.12, durante 144 horas.

Nas análises laboratoriais (quadro 5.9), apenas foi possível verificar a presença de *S. aureus* (1 logUFC/g) na amostra conservada a 10°C no T6 (144 horas), enquanto que, através da previsão (quadro 5.10), se conseguem detetar *S. aureus* em concentrações superiores a 5 UFC/g (>0,70 logUFC/g) às 120 horas. Contudo, á semelhança do verificado nas amostras anteriores, esta diferença pode não indicar nenhum desfasamento entre a previsão e a realidade, uma vez que não foi efetuada nenhuma análise laboratorial às 120 horas. Apesar de a previsão ter apontado um valor mais elevado do que aquele que se verificou experimentalmente, a diferença entre os resultados dos dois métodos de análise para as 144 horas foi de apenas 0,63 logUFC/g, ou seja, de cerca de 4 vezes mais UFC/g.

Para esta amostra efetuou-se, igualmente, a previsão através do *software* PMP (quadro 5.11 e figura 5.4).

**Quadro 0.11**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *S. aureus*, com e sem fase Lag, na amostra A10.12, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
		Lag	No Lag
10	0	3,05	3,43
	24	3,12	3,72
	48	3,25	4,09
	72	3,47	4,53
	96	3,76	5,01
	120	4,15	5,51
	144	4,59	6,01



**Figura 0.4**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *S. aureus*, na amostra A10.12, durante 144 horas.

Os resultados apresentados no quadro 5.11, mostram que a velocidade de crescimento é mais elevada quando, na previsão, não se considera a fase Lag, o que faz todo o sentido, porque, ao não se considerar esta fase, considera-se que os microrganismos estão perfeitamente adaptados ao meio. De uma forma geral, com ou sem fase Lag, o PMP exibe uma taxa de crescimento, de *S. aureus*, em A10.12, mais elevada do que a verificada com a ferramenta ComBase (quadro 5.10), como é perceptível através da comparação entre a figura 5.3 e 5.4. Deste modo, verifica-se que para as 144 horas, a diferença dos resultados entre as duas previsões é de 3,59 (com Lag) e 5,01 logUFC/g (sem Lag). Comparando com os resultados obtidos nas análises laboratoriais, o número de UFC/g estimado pelo PMP foi cerca de 3890 vezes (com Lag) e 102329 vezes (sem Lag) superior. Assim, para esta amostra a ferramenta ComBase apresentou resultados mais próximos da realidade.

O quadro 5.12 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.13.

**Quadro 0.12**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.13 conservada a 5°C (A5.13) e a 10°C (A10.13).

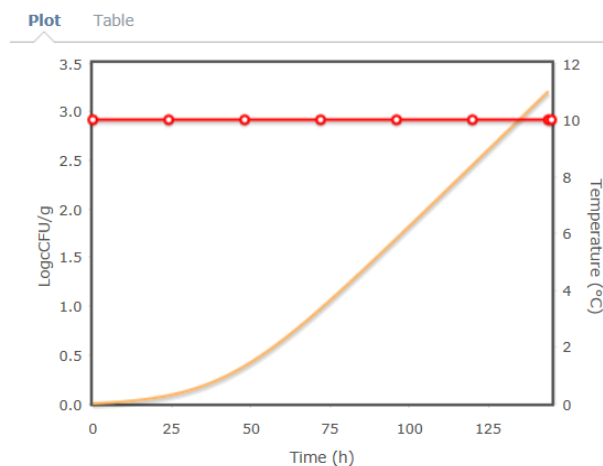
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.13				A10.13			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>								1,30
<i>S. aureus</i>								1,85
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	4,00	>6,48	>6,48	>6,48	4,00	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,814			5,68			0,126		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

Os resultados apresentados no quadro 5.12, mostram a presença de *E. coli* e de *S. aureus* detetados a partir das 144 horas quando a amostra foi conservada a 10°C (A10.13) e o desenvolvimento expressivo de microrganismos totais a 30°C, quando a amostra foi conservada a 5°C (A5.13) ou a 10°C (A10.13). O resultado da previsão do crescimento da *E. coli* nesta amostra, obtido através do ComBase, encontra-se no quadro 5.13 e na figura 5.5.

**Quadro 0.13**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.13, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,08
	48	0,39
	72	0,98
	96	1,7
	120	2,45
	144	3,21



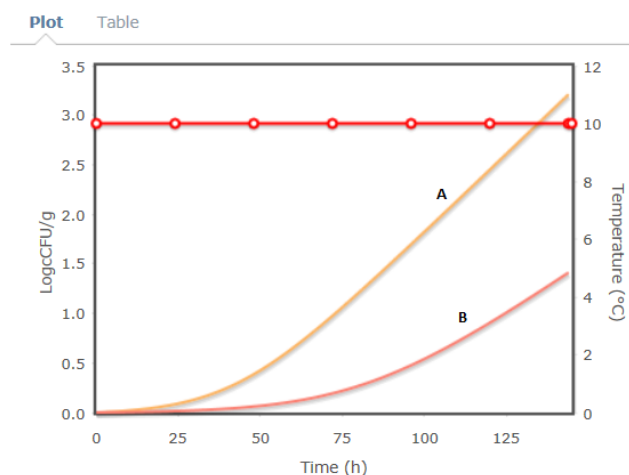
**Figura 0.5-**Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.13, durante 144 horas.

O quadro 5.12, revela que a presença de *E.coli* só foi detetada laboratorialmente às 144 horas, enquanto que o resultado da previsão indica a sua deteção às 72 horas ( $\log_{10} \text{UFC} > 0,7$ ). A previsão apontou para as 144 horas, um valor de 3,21  $\log_{10} \text{UFC/g}$ , ou seja, mais uma vez, o valor da previsão foi superior ao resultado da análise laboratorial, que foi de 1,30  $\text{UFC/g}$ . Assim, pode concluir-se que a velocidade de desenvolvimento prevista pelo ComBase foi superior à observada em laboratório.

Os resultados da previsão para o crescimento de *S. aureus* nesta amostra, encontram-se no quadro 5.14 e figura 5.6.

**Quadro 0.14-**Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *S. aureus*, na amostra A10.13, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração ( $\log_{10} \text{UFC/g}$ )
10	0	0
	24	0,01
	48	0,06
	72	0,19
	96	0,48
	120	0,91
	144	1,41



**Figura 0.6**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase, do crescimento de *E. coli* (A) e *S. aureus* (B), na amostra A10.13, durante 144 horas.

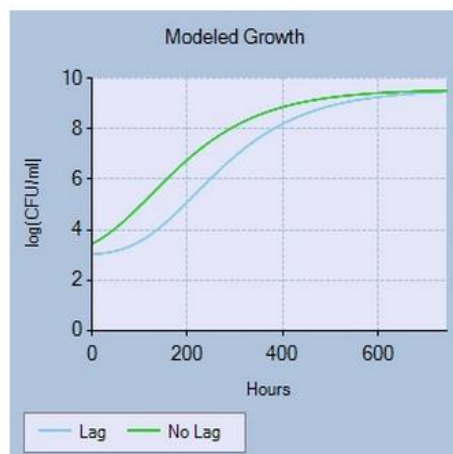
Comparando os quadros 5.12 e 5.14, é visível que o aparecimento de células de *S. aureus* em número superior a 5 UFC/g, se inicia para a previsão do ComBase às 120 horas e para a análise em laboratório às 144 horas. O número de células em T6 previsto pelo ComBase, foi cerca de 0,4 vezes inferior ao obtido na análise laboratorial.

Os valores para a previsão do crescimento de *S. aureus* na amostra A10.13 de acordo com o PMP (quadro 5.15 e figura 5.7), afastaram-se muito mais da realidade, quer quando se considerou a existência de fase lag (valor de UFC/g cerca de 175 vezes superior), quer quando não se considerou a existência desta fase (valor de UFC/g cerca de 8 105 superior).

**Quadro 0.15**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *S. aureus*, com e sem fase Lag, na amostra A10.13, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
		Lag	No Lag
10	0	3,02	3,43
	24	3,06	3,69
	48	3,14	4,02
	72	3,28	4,41
	96	3,48	4,84
	120	3,76	5,31
	144	4,10	5,76





**Figura 0.7**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *S. aureus*, na amostra A10.13, durante 144 horas.

O quadro 5.16 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.15.

**Quadro 0.16**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.15 conservada a 5°C (A5.15) e a 10°C (A10.15).

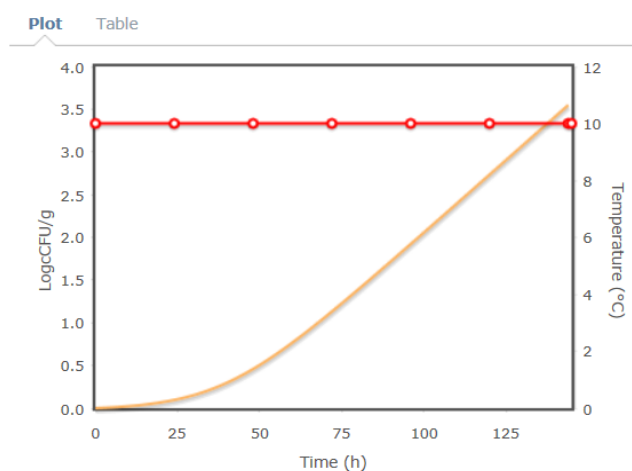
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.15				A10.15			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>						1,00	2,16	3,60
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,85	5,23	>6,48	>6,48	3,85	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,862			5,83			0,134		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

Os resultados apresentados no quadro 5.16 mostram o desenvolvimento de *E. coli* a partir das 48 horas quando a amostra foi conservada a 10°C (A10.15). Os microrganismos totais a 30°C apresentam resultados elevados quando a amostra foi conservada a 5°C (A5.15) ou a 10°C (A10.15). O resultado da previsão do crescimento de *E. coli* nesta amostra obtido através do ComBase, encontra-se no quadro 5.17 e na figura 5.8.

**Quadro 0.17**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.15, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,1
	48	0,46
	72	1,13
	96	1,92
	120	2,73
	144	3,55



**Figura 0.8**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.15, durante 144 horas.

Verifica-se, consultando os quadros 5.16 e 5.17, que para as 48 horas, a previsão do ComBase exibe 0,46 logUFC/g e a análise laboratorial 1,00 logUFC/g; já para as 96 horas, os valores foram, respectivamente, de 1,92 e 2,16 logUFC/g; por fim, para as 144 horas, os valores são mais semelhantes que os anteriores, havendo um distanciamento, entre os resultados, de apenas 0,05 logUFC/g, posto isto, é possível verificar que a previsão calculada pelo ComBase, se aproximou dos valores resultantes da análise laboratorial.

O quadro 5.18 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra A.16.

**Quadro 0.18**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra A.16 conservada a 5°C (A5.16) e a 10°C (A10.16).

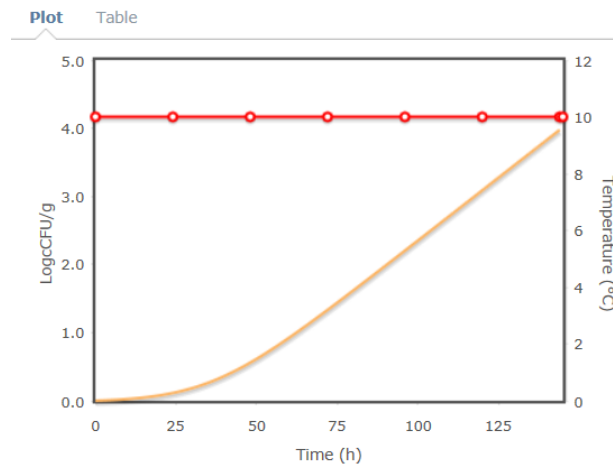
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	A5.16				A10.16			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>						3,06	3,12	3,60
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,30	>6,48	>6,48	>6,48	3,30	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,818			5,83			0,074		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

Consultando a quadro 5.18, é possível verificar o aparecimento de *E. coli*, às 48 horas de conservação a 10°C (A10.16), bem como uma velocidade de crescimento dos microrganismos totais a 30°C expressivamente elevada. O resultado da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli* nesta amostra, encontra-se no quadro 5.19 e na figura 5.9.

**Quadro 0.19**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.16, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,11
	48	0,56
	72	1,33
	96	2,2
	120	3,09
	144	3,98



**Figura 0.9**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra A10.16, durante 144 horas.

A comparação dos resultados da análise laboratorial com os da previsão, mostra que o resultado auferido pela análise microbiológica para as 48 horas, foi superior ao previsto pela ferramenta preditiva; o mesmo se verificou para as 96 horas; por último, para T6, o quadro 5.18, indica um valor de 3,60 e o quadro 5.19, um valor mais elevado, de 3,98 UFC/g, ou seja, um valor mais elevado na previsão do que na análise laboratorial.

### 5.3. Aplicação das ferramentas preditivas para previsão do crescimento dos microrganismos nas amostras de carne de porco

Tal como no caso das amostras de carne de vaca, também com as amostras de carne de porco, se utilizaram duas ferramentas preditivas, o *software* ComBase e o *software* PMP. Uma vez que não se detectou *Salmonella* nem *S. aureus*, em nenhuma das amostras de carne de porco analisadas, não foram efetuadas previsões para estes microrganismos nestas amostras. Por limitações dos *softwares* e devido aos resultados obtidos, apenas foi possível efetuar previsões para o crescimento de *E. coli* à temperatura de 10°C com o *software* ComBase. Já no caso da *L. monocytogenes* foi possível efetuar previsões a 5°C e a 10°C, tanto no ComBase como no PMP. Tal como, com as amostras de carne de vaca, também neste caso, apenas se efetuaram previsões para as amostras que apresentaram resultados positivos. Desta forma, não foram utilizadas, nesta análise, as amostras de carne de porco com os códigos B5.1/B10.1, B5.2/B10.2, B5.5/B10.5, B5.9/B10.9, B5.11/B10.11, B5.12/B10.12, B5.14/B10.14 e B5.17/B10.17.

O quadro 5.20 apresenta os resultados das análises aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos respeitantes à amostra B3, encontrando-se os resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, nesta amostra, no quadro 5.21 e figura 5.10.

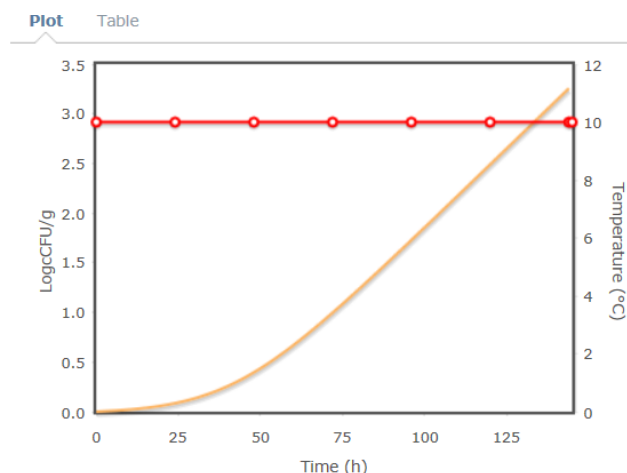
**Quadro 0.20**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B3 conservada a 5°C (B5.3) e a 10°C (B10.3).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.3				B10.3			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>		1,00	1,48	-		1,60	1,70	2,48
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	4,00	>6,48	>6,48	>6,48	4,00	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,913			5,55			0,075		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.21**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.3, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,09
	48	0,40
	72	1,00
	96	1,73
	120	2,49
	144	3,26



**Figura 0.10**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.3, durante 144 horas.

Como se pode verificar no quadro 5.20, a *E.coli* foi detetada nesta amostra ao fim de 48 horas de conservação quer a 5 quer a 10°C. Contudo, foi possível verificar que a velocidade de crescimento desta bactéria foi superior na temperatura mais elevada, isto é, para B10.3. No tempo 6, para B5.3, não foi possível efetuar as contagens devido a um problema experimental ocorrido com as respetivas placas de Petri. Ainda neste quadro, é possível ver que os resultados da contagem dos microrganismos totais a 30°C foram elevados, tanto para 5°C como para 10°C.

Comparando os valores obtidos pela previsão do ComBase, com os valores adquiridos pela análise laboratorial, na amostra B10.3, verifica-se, que no quadro 5.20, às 48 horas, o resultado foi de 1,60 logUFC/g, enquanto no quadro 5.21 o resultado foi de 0,4 logUFC/g; para as 96 horas, os resultados foram semelhantes, isto é, a contagem em laboratório, apresentou um valor de 1,70 e a previsão da ferramenta ComBase, um valor de 1,73 logUFC/g, diferenciando-se apenas por 0,03 logUFC/g; às 144 horas, verifica-se um valor de 2,48 logUFC/g na contagem e 3,26 logUFC/g na previsão, verificando-se uma diferença, entre os resultados, superior à anterior, sendo esta de 0,78 logUFC/g. Verificou-se então, que os resultados da análise em laboratório, demonstraram uma velocidade de desenvolvimento superior para as 48 horas, mas inferior para as 96 e as 144 horas, do que a previsão calculada pela ferramenta ComBase.

Analisando o quadro 5.22, é perceptível o desenvolvimento de *E. coli* na amostra B10.4, desde as 96 horas. Para além disto, verificou-se, igualmente, que os resultados das contagens de microrganismos totais a 30°C foram elevados

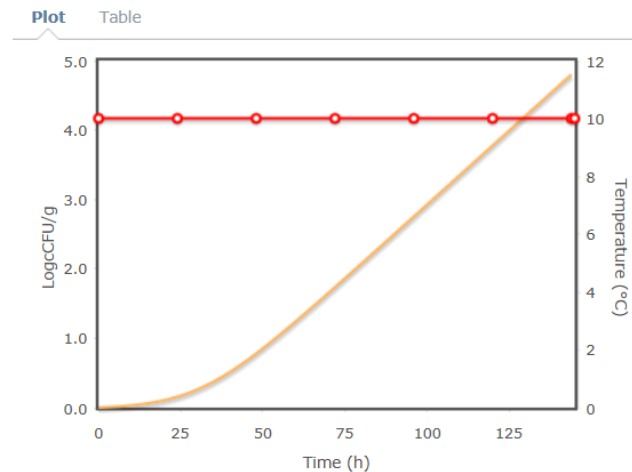
**Quadro 0.22**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B4 conservada a 5°C (B5.4) e a 10°C (B10.4).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.4				B10.4			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E. coli</i>							1,78	2,95
<i>S. aureus</i>								
<i>L. monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	>6,48	>6,48	>6,48	>6,48	>6,48	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,882			6,36			0,063		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.23**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra B10.4, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,16
	48	0,78
	72	1,74
	96	2,75
	120	3,78
	144	4,80



**Figura 0.11**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra B10.4, durante 144 horas.

O quadro 5.22 demonstra que o desenvolvimento de células de *E.coli* foi detetado a partir das 96 horas, já o quadro 5.23, indica que esse mesmo crescimento atinge valores superiores a 5 UFC/g a partir das 48 horas. Para as 96 horas, o resultado obtido, através da contagem em laboratório, foi de 1,78 logUFC/g e a partir da previsão do *software* ComBase, foi de 2,75 logUFC/g, valores estes, que se distanciam por 0,97 logUFC/g; para T6, o quadro 5.22 indica um valor de 2,95, enquanto a previsão do ComBase apresenta um valor de 4,8 logUFC/g, obtendo uma diferença de 1,85 logUFC/g, sendo superior à anterior. Posto isto, verificou-se que os resultados obtidos pelo ComBase preveem, durante todos os momentos, uma velocidade de desenvolvimento de *E.coli* mais acentuada, do que a análise realizada em laboratório, sendo que a diferença dos resultados obtidos através destes dois métodos de análise, foi aumentando com o decorrer do tempo.

O quadro 5.24 apresenta os resultados obtidos para a amostra B6. Nesta amostra, detetou-se crescimento de *E.coli*, a partir das 48 horas de conservação a 10°C (B10.6) e um desenvolvimento elevado de microrganismos totais a 30°C em ambas as temperaturas de conservação. A previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli* nesta amostra conservada a 10°C (quadro 5.25 e figura 5.12), revela valores de *E. coli* superiores a 5 UFC/g, a partir das 48 horas de conservação (valor de logUFC/g>0,7). Para as 96 horas, o *software* apresenta um valor de 2,42 logUFC/g que ultrapassa os 1,78 logUFC/g indicados no quadro 5.24; já para as 144 horas, o *software* ComBase prevê um crescimento superior ao observado em laboratório, exibindo resultados de 4,29 logUFC/g contra os 1,85 logUFC/g obtidos nas placas, o que representa uma diferença de 2,44 logUFC/g. Mais uma vez, se regista que a diferença entre a previsão e a realidade vai sendo mais acentuada com o passar do tempo de conservação.



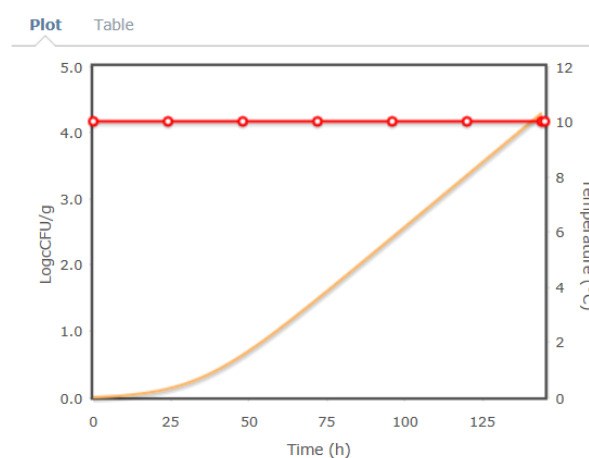
**Quadro 0.24**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B6 conservada a 5°C (B5.6) e a 10°C (B10.6).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.6				B10.6			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>						1,30	1,78	1,85
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	4,00	>6,48	>6,48	>6,48	4,00	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,835			5,98			0,05		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.25**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli*, na amostra B10.6, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,13
	48	0,64
	72	1,49
	96	2,42
	120	3,35
	144	4,29



**Figura 0.12**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.6, durante 144 horas.

Os resultados obtidos com a amostra B10 (quadro 5.26), revelam o desenvolvimento de *E.coli*, em B10.7, detetado a partir das 96 horas, bem como, um desenvolvimento acentuado de microrganismos totais a 30°C, durante todo o tempo de análise laboratorial. Comparando estes resultados com os previstos através do ComBase (quadro 5.27 e figura 5.13), verifica-se novamente um valor mais elevado nos resultados previstos do que nos resultados obtidos. Assim, para as 96 horas, o valor estimado foi de 2,08 e o valor obtido de 1,85 logUFC/g, originando, entre si, uma distância de apenas 0,23 logUFC/g e para as 144 horas, o valor estimado foi de 3,79, enquanto que, o obtido foi de 1,90 logUFC/g, permitindo perceber que os dois valores se distanciam por 1,89 logUFC/g, ou seja, que a discrepância foi novamente aumentando com o tempo de conservação.

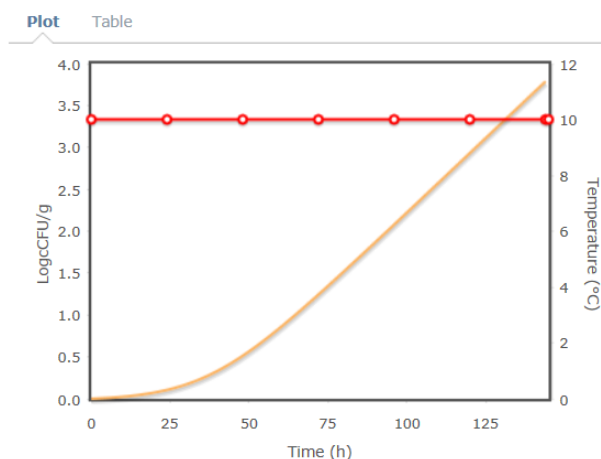
**Quadro 0.26**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B7 conservada a 5°C (B5.7) e a 10°C (B10.7).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.7				B10.7			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>							1,85	1,90
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	4,47	>6,48	>6,48	>6,48	4,47	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,907			5,95			0,108		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.27**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.7, durante 144 horas,

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,11
	48	0,51
	72	1,24
	96	2,08
	120	2,93
	144	3,79



**Figura 0.13**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.7, durante 144 horas.

Os resultados obtidos com a amostra B8 (quadro 5.28) revelaram, para além do crescimento acentuado de microrganismos a 30°C, o desenvolvimento *L. monocytogenes* detetado a partir das 96 horas de conservação, quer a 5°C (B5.8) quer a 10°C (B10.8), embora com um crescimento mais acentuado a 10°C. A diferença dos resultados obtidos para os da previsão do ComBase (quadro 5.29 e figura 5.14) foi, para as 96 horas, de 2,11 logUFC/g e para as 144 horas, de 3,07 logUFC/g, na amostra B5.8. No caso da amostra B10.8, essas diferenças foram bastante menos acentuadas, sendo de 0,43 e 1,12 logUFC/g, para as 96 e para as 144 horas, respectivamente. Em ambas as temperaturas se verificou que a divergência entre a previsão e a realidade foi aumentando ao longo do tempo.

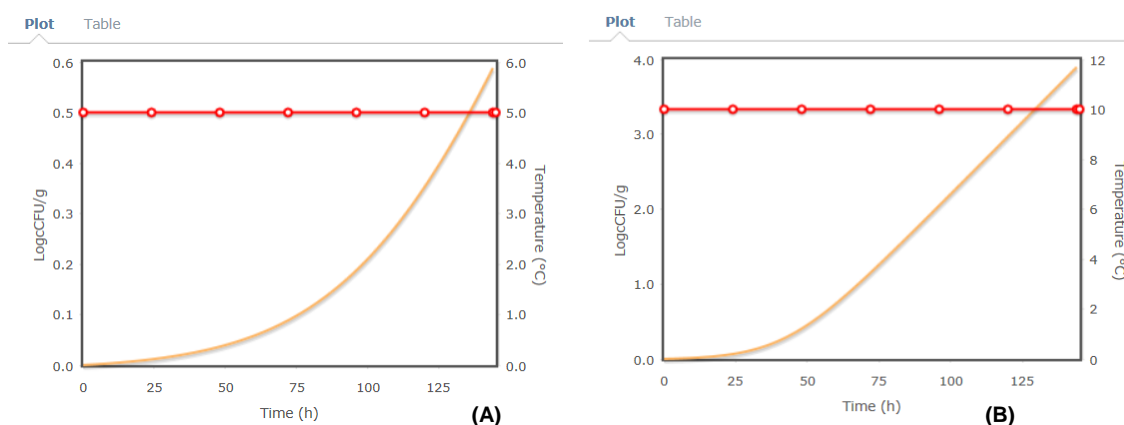
**Quadro 0.28**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B8 conservada a 5°C (B5.8) e a 10°C (B10.8).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.8				B10.8			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>								
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>			2,30	2,48			2,48	2,78
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	6,30	>6,48	>6,48	>6,48	6,30	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,847			6,16			0,065		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.29**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B5.8 e B10.8, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura 5°C	Temperatura 10°C
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
0	0	0
24	0,01	0,07
48	0,04	0,40
72	0,09	1,15
96	0,19	2,05
120	0,35	2,97
144	0,59	3,90



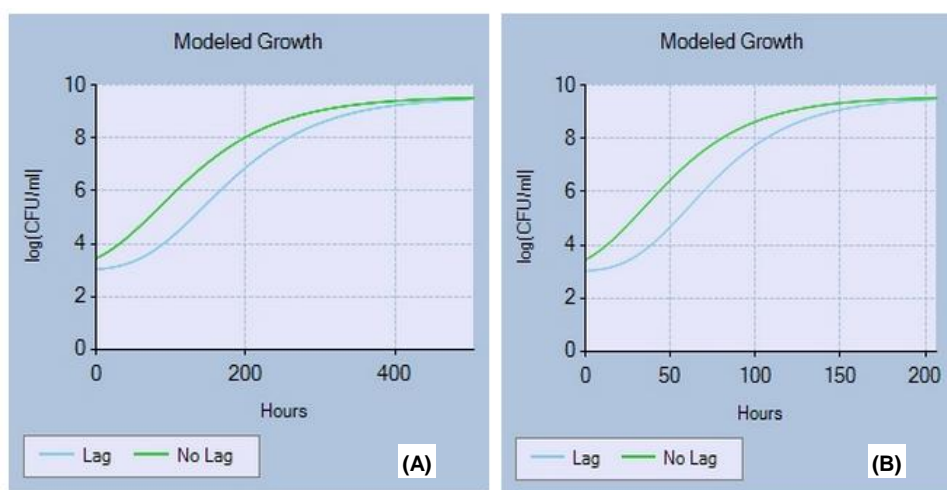
**Figura 0.14**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes* na B5.8 (A) e B10.8 (B), durante 144 horas.

A previsão do PMP para o crescimento de *L. monocytogenes* a 5 e a 10°C nesta amostra, afastou-se ainda mais da realidade (quadro 5.30 e figura 5.15). Assim, para a amostra conservada a 5°C para as 96 horas, os valores reais e resultantes da previsão diferiram em 1,83 logUFC /g, com Lag e 3,39 logUFC/g, sem fase Lag e para as 144 horas, a discrepância é de 2,91 logUFC/g com Lag e de 4,46 logUFC/g sem Lag. Desta forma, verifica-se que a previsão do PMP, apresentou uma velocidade de crescimento bastante superior quer aos resultados reais obtidos em laboratório, quer à previsão do ComBase. Claramente, os resultados da previsão da ferramenta PMP, também evidenciam uma velocidade de desenvolvimento de *L. monocytogenes*, em B10.8, bastante mais elevada do que a realidade. Assim, a previsão do PMP para B10.8 às 96 h é de 7,56 logUFC/g, com Lag e 8,52 UFC/g, sem Lag, obtendo-se, então, uma divergência de, respetivamente, 5,08 e 6,04 logUFC/g; já às 144 horas, o resultado obtido na análise realizada em laboratório, é de 2,78 logUFC/g, enquanto a previsão do PMP, exibe 8,99 (Lag) e 9,29 logUFC/g (sem Lag), apresentando, desta forma, uma diferença expressiva de, respectivamente, 6,21 e 6,51 logUFC/g. Posto isto, denota-se que a previsão do PMP para a B10.8, manifesta uma velocidade de

crescimento significativamente mais elevada que a previsão do PMP para a B5.8 e que, em ambas as temperaturas, os resultados desta ferramenta preditiva, demonstraram sempre, uma velocidade de crescimento mais elevada, tanto em relação aos resultados obtidos em laboratório, como em relação às previsões obtidas através do ComBase.

**Quadro 0.30**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B5.8 e B10.8, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura 5°C		Temperatura 10°C	
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)		Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
	Lag	No Lag	Lag	No Lag
0	3,03	3,43	3,03	3,43
24	3,11	3,84	3,37	4,68
48	3,30	4,38	4,55	6,31
72	3,64	5,02	6,18	7,65
96	4,13	5,69	7,56	8,52
120	4,73	6,34	8,47	9,02
144	5,39	6,94	8,99	9,29



**Figura 0.15**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes* na amostra B5.8 (A) e B10.8 (B) durante 144 horas.

No quadro 5.31 apresentam-se os resultados obtidos em laboratório para a amostra B10 em ambas as temperaturas de conservação. Assim, para esta amostra, observou-se um amplo crescimento de microrganismos totais a 30°C, tendo sido possível enumerar *E. coli* e *L. monocytogenes* a 5 e a 10°C. Contudo, as contagens destas duas bactérias foram sempre superiores para B10.10 do que para B5.10. Em B5.10, a *E.coli* detetou-se às 96 horas e a *L. monocytogenes* apenas às 144 h, no entanto para T6, as contagens de ambas as bactérias, foram idênticas; já para B10.10 foi possível detetar a *L. monocytogenes* logo às 48 horas enquanto que a *E. coli* só se detectou às 96 horas. Nesta temperatura de conservação, a *L.monocytogenes* apresentou contagens mais elevadas do que a *E.coli*.

**Quadro 0.31**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B10 conservada a 5°C (B5.10) e a 10°C (B10.10).

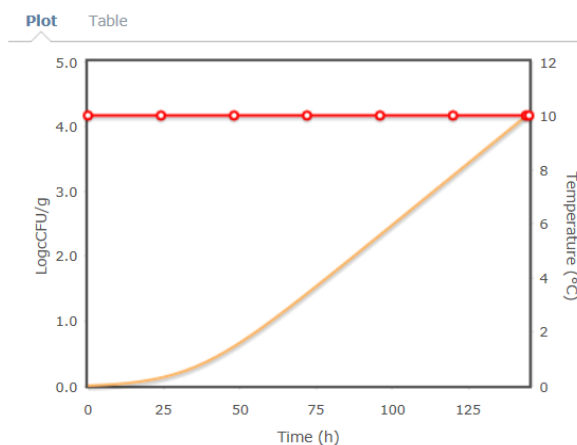
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.10				B10.10			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>			1,30	2,00			2,85	2,95
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>				2,00		2,79	2,95	3,30
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	5,00	>6,48	>6,48	>6,48	5,00	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,841			7,17			0,065		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

Apesar de se ter detetado o crescimento de *E. coli* a 5°C, a previsão através do ComBase, só pode ser efetuada para a temperatura de 10°C (quadro 5.32 e figura 5.16) devido às limitações deste *software*. Já para a *L. monocytogenes*, foi possível efetuar a previsão em ambas as temperaturas (quadro 5.33 e figura 5.17).

**Quadro 0.32**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.10, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,12
	48	0,61
	72	1,42
	96	2,33
	120	3,24
	144	4,16

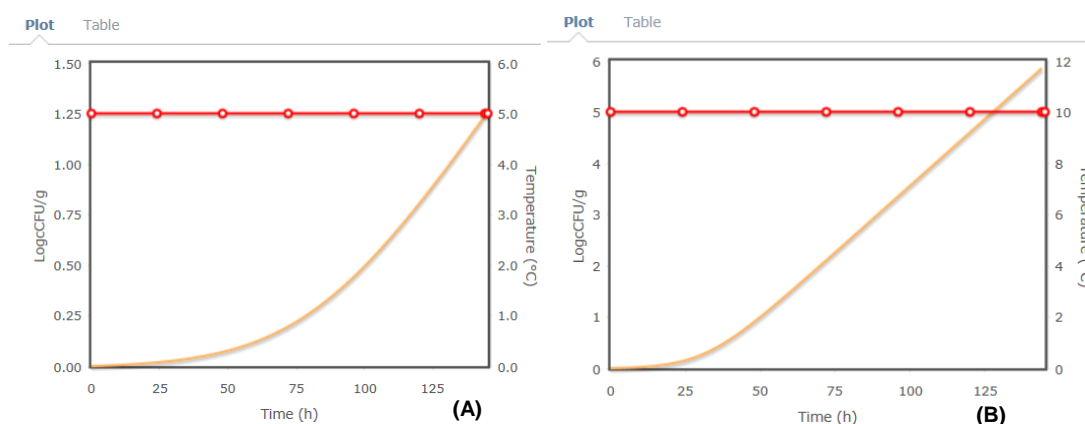


**Figura 0.16**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.10, durante 144 horas.

Comparando o desenvolvimento de *E. coli* na amostra B10.10 com a previsão do ComBase, é possível verificar que às 96 horas, o valor real foi de 2,85 logUFC/g e o previsto de 2,33 logUFC/g, existindo entre estes, uma distância de 0,52 logUFC/g; para as 144 horas, o valor obtido em laboratório, foi de 2,95 e o obtido através da previsão de 4,16 UFC/g, o que se traduz por uma diferença de 1,21 logUFC/g, ou seja, mais uma vez, a divergência aumentou com o aumento do tempo.

**Quadro 0.33**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, nas amostras B5.10 e B10.10, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura 5°C	Temperatura 10°C
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
0	0	0
24	0,02	0,14
48	0,07	0,91
72	0,2	2,1
96	0,44	3,35
120	0,81	4,6
144	1,24	5,85



**Figura 0.17**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B5.10 (A) e B10.10 (B), durante 144 horas.

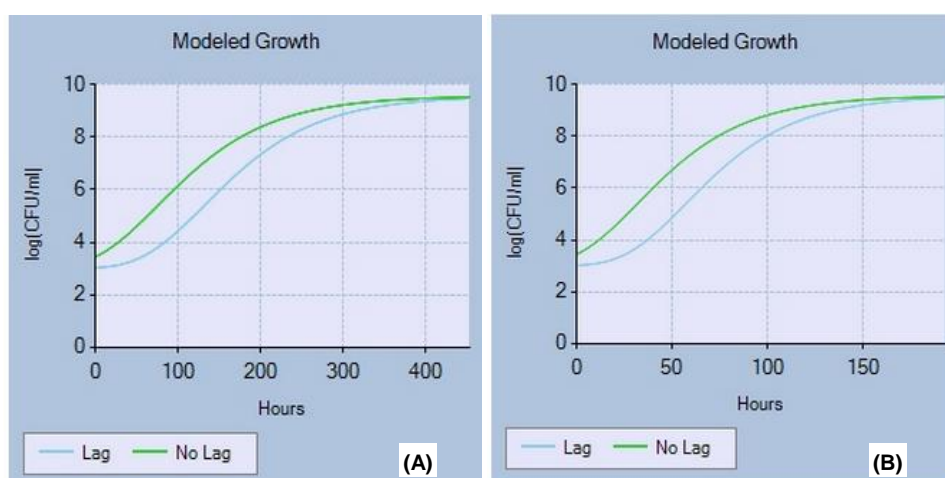
Em relação ao desenvolvimento da *L. monocytogenes*, foi possível verificar que a previsão a 5°C ficou abaixo dos valores reais, enquanto que, a previsão a 10°C, para tempos superiores a 96 horas, ficou acima dos mesmos valores. Assim, a previsão obtida pelo ComBase para o crescimento a 5°C, indicou para as 144 horas, um valor de 1,24 logUFC/g, enquanto que, o valor real foi de 2,00 logUFC/g. Já para o crescimento a 10°C, o ComBase indicou um valor inferior à realidade para as 48 horas, mas superior para as 96 horas (3,35 contra 2,95 logUFC/g) e para as 144 horas (5,85 contra 3,30 logUFC/g). Mais uma vez, a discrepância foi sendo superior à medida que o tempo foi aumentando.

Comparando as previsões do ComBase para o desenvolvimento de *L.monocytogenes*, nas duas temperaturas, isto é, para B5.10 e B10.10, verifica-se que tal como aconteceu na realidade, também na previsão, a velocidade de crescimento foi superior na temperatura de 10°C.

As previsões para o crescimento de *L.monocytogenes* oferecidas pelo PMP, encontram-se no quadro 5.34 e na figura 5.18. A comparação dos valores estimados com os reais mostra, mais uma vez, uma discordância profunda, sendo os valores da previsão muito superiores aos reais para todos os tempos e para as duas temperaturas. Assim, para 5°C a diferença entre a previsão e a realidade foi de 4,02 logUFC/g com Lag e 5,34 logUFC/g sem Lag, para as 144 horas. Para a temperatura de 10°C, a mesma diferença foi de 4,91 logUFC/g com Lag e 5,77 logUFC/g sem Lag, para as 96 horas e 5,84 logUFC/g com Lag e 6,07 logUFC/g sem Lag, para as 144 horas. Posto isto, é visível que a simulação efetuada no PMP, para o crescimento de *L. monocytogenes*, em B5.10 e em B10.10, apresentou uma taxa de crescimento muito superior à observada em laboratório, mesmo considerando a existência da fase Lag.

**Quadro 0.34**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B5.10 e B10.10, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura 5°C		Temperatura 10°C	
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)		Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
	Lag	No Lag	Lag	No Lag
0	3,02	3,43	3,02	3,43
24	3,11	3,90	3,39	4,81
48	3,32	4,54	4,72	6,56
72	3,74	5,27	6,47	7,91
96	4,31	6,02	7,86	8,72
120	5,77	6,72	8,69	9,15
144	6,02	7,34	9,14	9,37



**Figura 0.18**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B5.10 (A) e B10.10 (B), durante 144 horas.-



Comparando a previsão do *software* PMP com a do ComBase, para o crescimento de *L. monocytogenes*, em B5.10 e em B10.10, verifica-se que a primeira ferramenta, obteve resultados expressivamente mais elevados, como é visível a partir da análise dos resultados obtidos, em ambos os *softwares*, tendo-se as previsões do ComBase aproximado mais aos resultados obtidos em laboratório.

No caso da amostra B13 (quadro 5.35), para além das contagens elevadas de microrganismos totais a 30°C, verificadas tanto a 5 como a 10°C, registou-se, igualmente, um valor elevado para a *L. monocytogenes*, detetada a partir as 48 horas, quando a amostra foi conservada a 10°C. Com efeito, a enumeração desta bactéria no laboratório apresentou a partir das 96 horas o resultado máximo, isto é, a contagem em placa excedeu as 150 colónias na última diluição.

**Quadro 0.35**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B13 conservada a 5°C (B5.13) e a 10°C (B10.13).

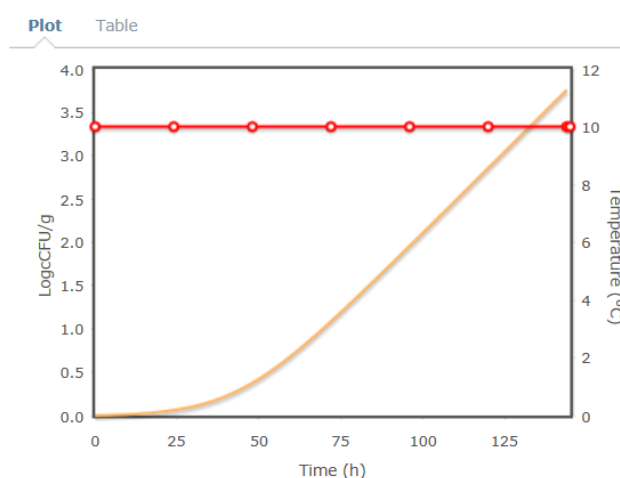
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.13				B10.13			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>								
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>						3,48	> 4,18	> 4,18
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	3,70	>6,48	>6,48	>6,48	3,70	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,829			6,10			0,041		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

A previsão do ComBase para esta amostra (quadro 5.36 e figura 5.19), ficou abaixo do valor real para as 48 horas (0,91 logUFC/g contra 3,48 logUFC/g). A partir das 96 horas, a análise em laboratório, apresentou o resultado máximo, apresentando-se o resultado como > 4,18 logUFC/g, enquanto o *software* ComBase, exibiu um resultado inferior, de 3,35 logUFC/g para as 96 horas e um resultado >4,18 logUFC/g, de 5,85 logUFC/g, para as 144 horas. Resumidamente, nesta amostra, a partir das 96 horas, a análise em laboratório apresentou resultados superiores ao máximo de colónias contáveis para *L. monocytogenes* em placa, não possibilitando uma comparação pormenorizada com a ferramenta ComBase, apesar de, para as 48 horas, os resultados da previsão terem sido inferiores aos da contagem.

**Quadro 0.36**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.13, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,14
	48	0,91
	72	2,1
	96	3,35
	120	4,6
	144	5,85

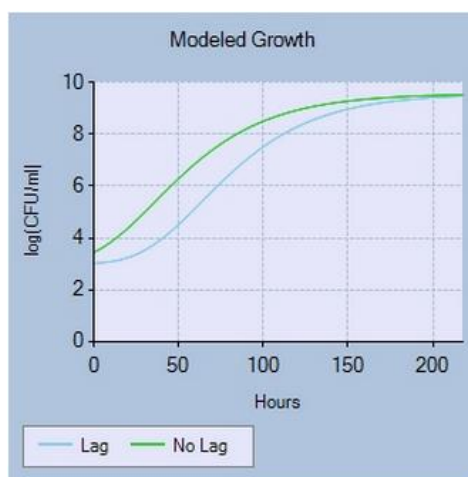


**Figura 0.19**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.13, durante 144 horas.

A previsão do PMP para esta mesma amostra B10.13 (quadro 5.37 e figura 5.20), excedeu os resultados da análise laboratorial para as 48 horas, considerando ou não a existência de uma fase lag. Para os tempos seguintes, isto é para as 96 e 144 horas, não é possível estabelecer comparações concretas devido a não se ter conseguido determinar o valor exato da contagem laboratorial. Relacionando as previsões das duas ferramentas preditivas, para o crescimento de *L. monocytogenes*, em B10.13, verifica-se que o PMP, possui a taxa de crescimento mais elevada, como é visível, comparando as quadros 5.36 com o 5.37, ou as figuras 5.19 com a 5.20.

**Quadro 0.37**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B10.13, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
		Lag	No Lag
10	0	3,02	3,43
	24	3,33	4,60
	48	4,39	6,15
	72	5,93	7,49
	96	7,32	8,39
	120	8,28	8,93
	144	8,87	9,23



**Figura 0.20**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.13, durante 144.

A amostra B15 (quadro 5.38) apresentou um elevado crescimento de microrganismos totais a 30°C, em ambas as temperaturas estudadas, tendo ainda sido possível detetar a presença de *E. coli* a partir das 96 horas de conservação a 10°C (B10.16). A previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli* nesta amostra (B10.15) (quadro 5.39 e figura 5.21), apresentou para as 96 horas, um resultado de 2,79 logUFC/g, distanciando-se por apenas 0,31 logUFC/g do valor real (2,48 logUFC/g). Para as 144 horas, a diferença entre estes dois valores foi de 2,26 logUFC/g, ou seja, mais acentuada do que a verificada às 96 horas.

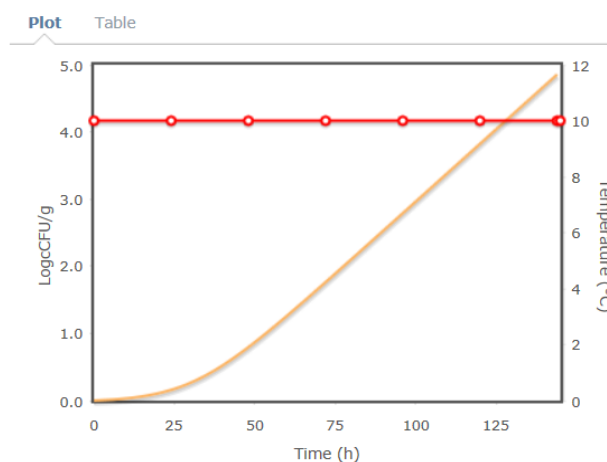
**Quadro 0.38**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B15 conservada a 5°C (B5.15) e a 10°C (B10.15).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.15				B10.15			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>							2,48	2,60
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	5,00	>6,48	>6,48	>6,48	5,00	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,864			6,49			0,06		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.39**-Previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.15, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,16
	48	0,8
	72	1,76
	96	2,79
	120	3,82
	144	4,86



**Figura 0.21**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.15, durante 144 horas.

A amostra B16 (quadro 5.40) apresentou um elevado crescimento de microrganismos totais a 30°C, em ambas as temperaturas estudadas, tendo ainda sido possível detetar a presença de *E. coli* a partir das 96 horas de conservação a 5°C (B5.16) e a 10°C (B10.16), sendo, no entanto, as contagens superiores a 10°C. A previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli* nesta amostra (B10.16) (quadro 5.41 e figura 5.22), apresentou para as 96 horas, um resultado de 2,23 logUFC/g, sendo menor por apenas 0,07 logUFC/g do valor real (2,30 logUFC/g). Para as 144 horas, a diferença entre estes dois valores foi de 1,41 logUFC/g, ou seja, mais acentuada do que a verificada às 96 horas. Mais uma vez, foi possível verificar um aumento da divergência entre a realidade e a previsão com o aumento do tempo de conservação.

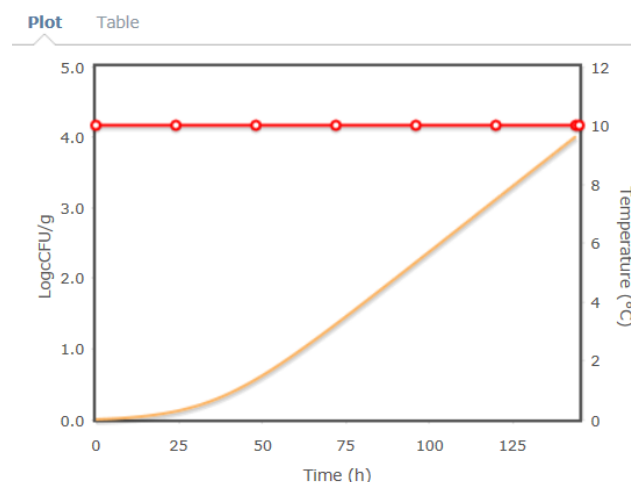
**Quadro 0.40**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B16 conservada a 5°C (B5.16) e a 10°C (B10.16).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.16				B10.16			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>			2,00	2,30			2,30	2,60
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>								
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	4,78	>6,48	>6,48	>6,48	4,78	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,845			6,00			0,111		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.41**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.16, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,12
	48	0,57
	72	1,35
	96	2,23
	120	3,12
	144	4,01



**Figura 0.22**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.16, durante 144 horas.

A amostra B18 (quadro 5.42) apresentou desenvolvimento de *L. monocytogenes*, tanto a 5°C como a 10°C, tendo, no entanto, o desenvolvimento a 10°C sido detetado mais cedo e atingindo contagens superiores ao desenvolvimento a 5°C. Relativamente aos microrganismos totais a 30°C, verificou-se que os seus resultados foram claramente elevados, principalmente a partir das 48 horas.

**Quadro 0.42**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B18 conservada a 5°C (B5.18) e a 10°C (B10.18).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.18				B10.18			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>								
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>				1,00			1,48	2,60
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	5,78	>6,48	>6,48	>6,48	5,78	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,914			6,25			0,076		

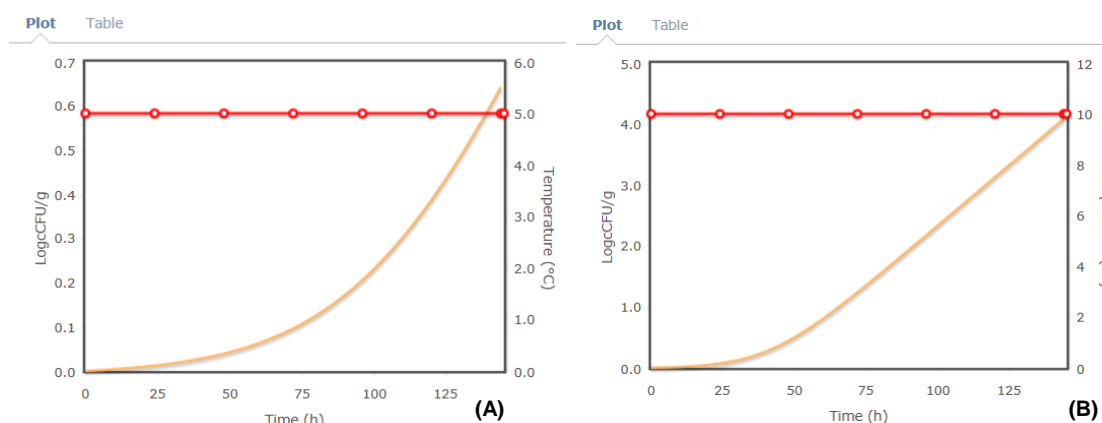
\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

A confrontação dos resultados da análise microbiológica em laboratório com os da previsão do ComBase (quadro 5.43 e figura 5.23) revela que, para a temperatura de 5°C a previsão do crescimento para as 144 horas, foi de 0,64 logUFC/g, portanto inferior em cerca de 0,36 logUFC/G do que a contagem real. Para a temperatura de 10°C, a previsão indicou um crescimento às 96 e às 144 horas superior às contagens reais em 0,69 e 1,48, respetivamente. Portanto, mais uma vez, a previsão do ComBase, foi ligeiramente inferior às contagens reais a 5°C e superior às mesmas

contagens a 10°C, tendo a divergência entre a previsão e a realidade aumentado com o decorrer do tempo. Tal como verificado no laboratório, também a previsão realizada pela ferramenta ComBase, indicou uma velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* mais elevada para a temperatura de 10°C, ou seja, para B10.18, do que para a temperatura de 5°C, ou seja, para B5.18.

**Quadro 0.43**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B5.18 e B.10.18, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura 5°C	Temperatura 10°C
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
0	0	0
24	0,01	0,07
48	0,04	0,44
72	0,1	1,24
96	0,21	2,17
120	0,39	3,13
144	0,64	4,08



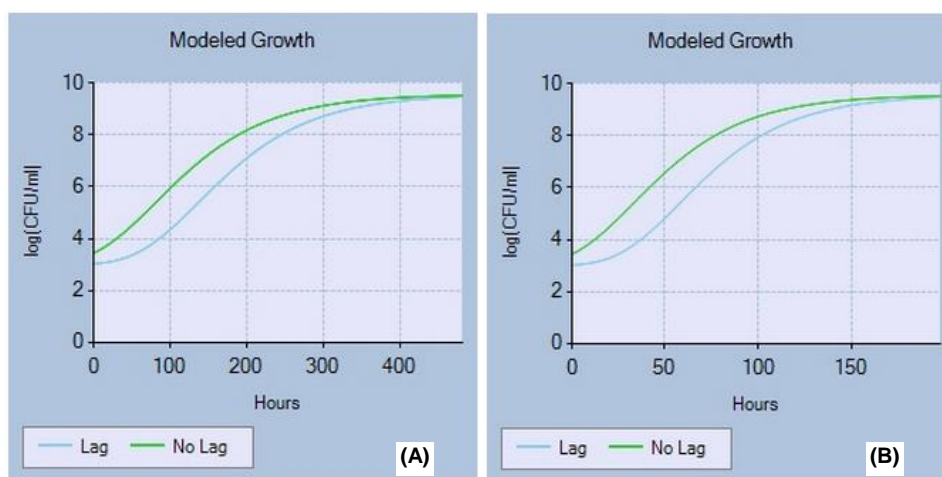
**Figura 0.23**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B5.18 (A) e B10.18 (B), durante 144 horas.

A previsão do PMP para o crescimento de *L. monocytogenes* nesta amostra (quadro 5.44 e figura 5.24) revelou, igualmente, uma taxa de crescimento mais elevada a 10°C do que a 5°C. Contudo, esta previsão foi, novamente, muito discordante da realidade, para ambas as temperaturas de conservação, considerando ou não a existência da fase Lag. Assim, para 5°C a discordância foi de 4,59 logUFC/g com Lag e 6,10 logUFC/g sem Lag, para as 144 horas. Para a temperatura de 10°C a mesma diferença foi de 6,28 logUFC/g com Lag e 7,15 logUFC/g sem Lag, para as 96 horas e 6,48 logUFC/g com Lag e 6,73 logUFC/g sem Lag, para as 144 horas. É notável, após observação dos resultados, que a previsão do PMP para o crescimento de *L. monocytogenes*,

em B5.18 e B10.18, apresentou uma taxa de crescimento, mais elevada que a observada em laboratório e do que a obtida pela previsão do ComBase.

**Quadro 0.44**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B5.18 e B10.18, durante 144 horas.

Tempo (h)	Temperatura de 5°C		Temperatura de 10°C	
	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)		Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
	Lag	No Lag	Lag	No Lag
0	3,03	3,43	3,03	3,43
24	3,12	3,86	3,41	4,75
48	3,33	4,44	4,69	6,44
72	3,70	5,12	6,39	7,79
96	4,24	5,82	7,76	8,63
120	4,89	6,49	8,61	9,10
144	5,59	7,10	9,08	9,33



**Figura 0.24**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L. monocytogenes*, na amostra B5.18 (A) e B10.18 (B), durante 144 horas.

Os resultados da análise de laboratório da amostra B19 (quadro 5.45), revelaram o desenvolvimento de *E. coli*, detetado a partir das 96 horas e de *L.monocytogenes*, detetado às 144 horas. A contagem dos microrganismos totais a 30°C nesta amostra foi, à semelhança do descrito para as amostras anteriores, elevada, tanto quando a amostra foi conservada a 5°C (B5.19) como a 10°C (B10.19).



**Quadro 0.45-**Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B19 conservada a 5°C (B5.19) e a 10°C (B10.19).

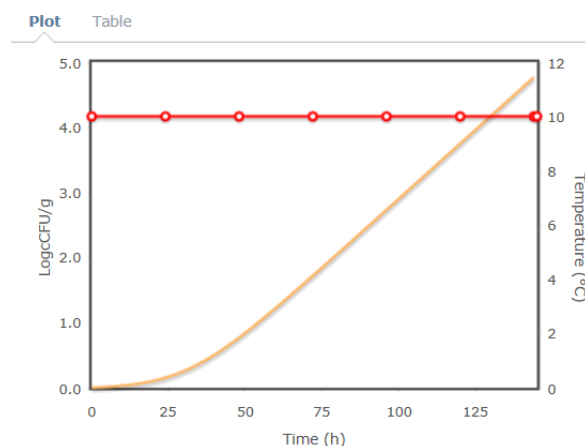
Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.19				B10.19			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>							1,48	1,78
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>								1,30
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	5,78	>6,48	>6,48	>6,48	5,78	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,902			6,32			0,086		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

A previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli* nesta amostra (quadro 5.48 e figura 5.25), apresenta um distanciamento em relação às contagens reais de 1,25 logUFC/g para as 96 horas e 2,99 logUFC/g para as 144 horas. Assim, a previsão obtida pelo *software* ComBase, apresentou uma velocidade de crescimento de *E.coli*, em B10.19, superior à observada em laboratório, aumentando a diferença entre os resultados obtidos e estimados com o decorrer do tempo, sendo, então, mais elevada às 144 horas.

**Quadro 0.46-**Resultados, da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.19, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,15
	48	0,77
	72	1,72
	96	2,73
	120	3,75
	144	4,77

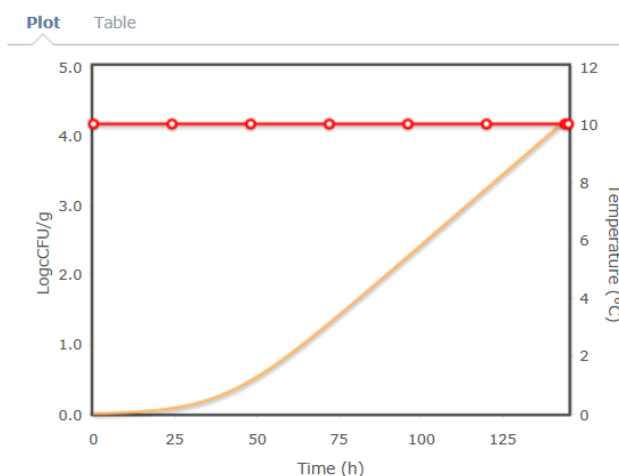


**Figura 0.25**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.19, durante 144 horas.

Para o desenvolvimento da *L.monocytogenes* em B10.19, a previsão do ComBase (quadro 5.47 e figura 5.26) foi de 4,21 logUFC/g para as 144 horas, o que representa um desvio de 2,91 log UFC/g em relação à contagem em placa. Já para as 96 horas, também se tinha observado uma discrepância, uma vez que na contagem, não se detetaram colónias e a previsão estimou um valor 2,26 logUFC/g.

**Quadro 0.47**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.19, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,07
	48	0,47
	72	1,3
	96	2,26
	120	3,24
	144	4,21

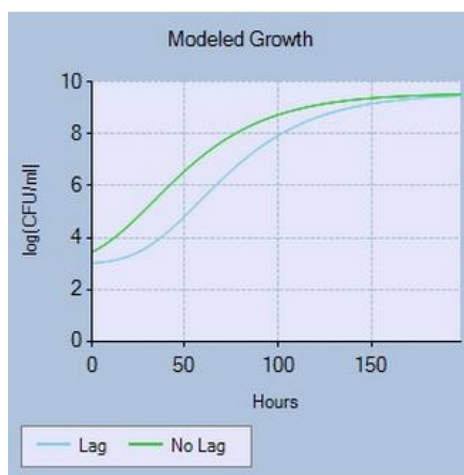


**Figura 0.26**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.19, durante 144.

A previsão obtida, através da ferramenta preditiva PMP, para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em B10.19 (quadro 5.48 e figura 5.27), apresentou uma taxa de crescimento mais elevada que os resultados obtidos através da contagem em laboratório e do que a ferramenta ComBase para a mesma amostra. Com esta ferramenta, com ou sem fase Lag, o desvio em relação à realidade foi, uma vez mais, bastante superior ao verificado com o ComBase.

**Quadro 0.48**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B10.19, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
		Lag	No Lag
10	0	3,02	3,43
	24	3,41	4,75
	48	4,69	6,44
	72	6,39	7,79
	96	7,76	8,63
	120	8,61	9,10
	144	9,08	9,33



**Figura 0.27**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.19, durante 144 horas.

Na amostra B20 foi possível detetar *E. coli* e *L. monocytogenes* a partir das 48 horas de conservação a 10°C, para além de um número elevado de microrganismos totais a 30°C (quadro 5.49). Na previsão do ComBase para o crescimento de *E. coli* nesta amostra (quadro 5.50 e figura 5.28), é visível que para as 48 horas, os resultados estimados pelo *software* foram inferiores aos obtidos nas contagens, distanciando-se por 2,38 logUFC/g; para as 96 horas, a diferença entre os resultados estimados e reais foi de 1,12 logUFC/g. Às 144 horas as contagens em laboratório, atingiram o valor máximo contável em placa, sendo o resultado apresentado como > 4,18 logUFC/g, não sendo possível de comparar com os valores obtidos pela previsão, visto não se tratar de um valor concreto, já a previsão do ComBase indica um resultado de 4,21 logUFC/g que é superior a 4,18 logUFC/g.

De forma geral, a análise microbiológica laboratorial, apresentou uma velocidade de crescimento mais elevada para *E.coli*, em B10.20, que a previsão obtida através do *software* ComBase, perfazendo a sua menor dissemelhança de resultados, às 96 horas.

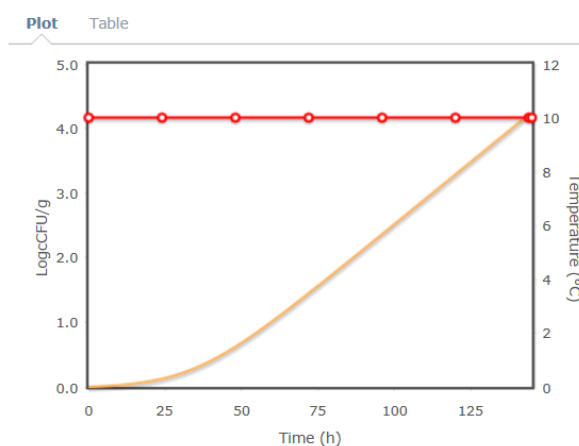
**Quadro 0.49**-Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos T0, T2, T4 e T6, para a amostra B20 conservada a 5°C (B5.20) e a 10°C (B10.20).

Microrganismos Log <sub>10</sub> UFC/g	B5.20				B10.20			
	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)	T0 (0h)	T2 (48h)	T4 (96h)	T6 (144h)
<i>E.coli</i>						3,00	3,48	>4,18
<i>S.aureus</i>								
<i>L.monocytogenes</i>						2,00	2,30	2,60
<i>Salmonella</i>	*				*			
Totais a 30°C	5,48	>6,48	>6,48	>6,48	5,48	>6,48	>6,48	>6,48
<b>a<sub>w</sub></b>			<b>pH</b>			<b>NaCl (%)</b>		
0,797			5,94			0,079		

\*negativo em 10g. Campos a cinza correspondem a amostras sem resultados positivos (<5UFC/g).

**Quadro 0.50**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.20, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,13
	48	0,62
	72	1,45
	96	2,36
	120	3,29
	144	4,21

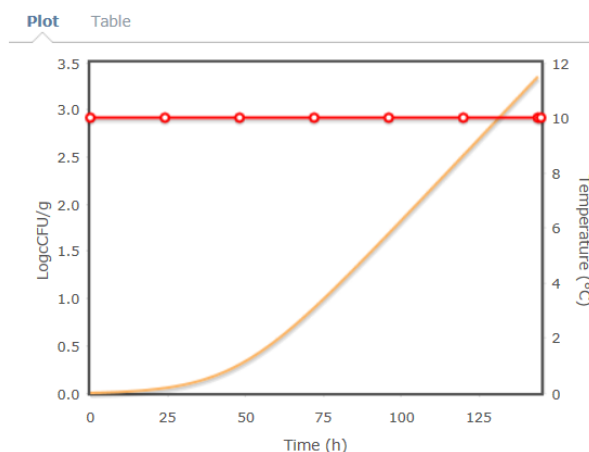


**Figura 0.28**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *E.coli*, na amostra B10.20, durante 144 horas.

Comparando os resultados obtidos pela contagem em laboratório com os da previsão do ComBase, para o crescimento de *L.monocytogenes* em B10.20 (quadro 5.51 e figura 5.29), verificou-se que, enquanto para as 48 e 96 horas os valores da previsão foram inferiores aos das contagens, para as 144 horas aconteceu o inverso. Às 48 horas, a diferença entre os resultados, obtidos e previstos, foi de 1,70 logUFC/g, às 96 horas essa diferença foi de 0,61 logUFC/g, apresentando-se menor que a anterior, e para as 144 hora, os resultados distanciaram-se por 0,75 logUFC/g.

**Quadro 0.51**-Resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.20, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)
10	0	0
	24	0,05
	48	0,3
	72	0,9
	96	1,69
	120	2,52
	144	3,35

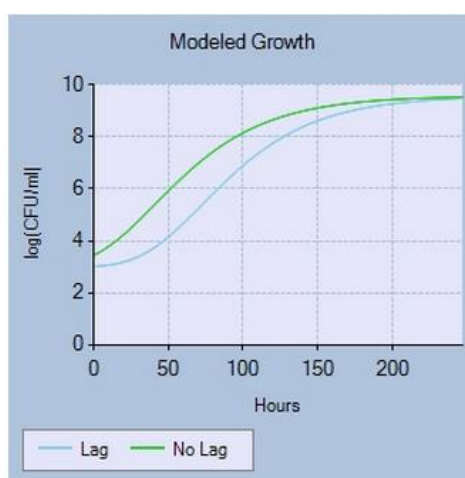


**Figura 0.29**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do ComBase para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.20, durante 144 horas.

A previsão calculada pela ferramenta PMP (quadro 5.52 e figura 5.30), apresentou, uma vez mais, resultados superiores à análise laboratorial, sendo as diferenças calculadas, entre os resultados, de 2,05 logUFC/g (com Lag) e 3,74 logUFC/g (sem Lag) para as 48 horas, 4,39 logUFC/g (com Lag) e 5,72 logUFC/g (sem Lag) para as 96 horas e 5,88 logUFC/g (com Lag) e 6,44 logUFC/g (sem Lag) para as 144 horas. Posto isto, é visível que a diferença entre os valores previstos e contados é crescente com o decorrer do tempo e que, como já referido, a previsão obtida pelo PMP apresenta uma taxa de crescimento mais elevada que os resultados obtidos em laboratório. Para além disto, comparando as previsões, para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em B10.20, obtidas com ComBase e com o PMP, foi visível que, mais uma vez, o PMP apresentou resultados mais elevados e mais distantes da realidade.

**Quadro 0.52**-Resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, com e sem fase Lag, na amostra B10.20, durante 144 horas.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Concentração (log <sub>10</sub> UFC/g)	
		Lag	No Lag
10	0	3,02	3,43
	24	3,25	4,43
	48	4,05	5,79
	72	5,35	7,07
	96	6,69	8,02
	120	7,75	8,65
	144	8,48	9,04



**Figura 0.30**-Gráfico representativo dos resultados da previsão do PMP para o crescimento de *L.monocytogenes*, na amostra B10.20, durante 144 horas.

## 5.4. Análise Global dos resultados

A aplicação dos dois modelos às várias amostras mostrou, que mesmo partindo de um mesmo valor de contaminação inicial, as previsões de crescimento de patógenos variaram bastante de amostra para amostra, revelando a importância do pH e da concentração de sal na previsão do crescimento bacteriano. Com efeito, pequenas variações nestes parâmetros originaram grandes diferenças na previsão do número de UFC/g (quadro 5.53).

**Quadro 0.53** Valores de pH, NaCl e previsão de UFC/g de acordo com o modelo ComBase para as amostras conservadas a 10°C que tiveram contagens positivas.

Amostras	pH	[NaCl] (%)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	
			96 horas	144 horas	144 horas	96 horas	144 horas
<b>A10.1</b>	6,32	0,101	2,57	19055	-	-	-
<b>A10.11</b>	5,86	0,081	178	10956	-	-	-
<b>A10.12</b>	5,92	0,146	-	-	43	-	-
<b>A10.13</b>	5,68	0,126	50	1622	26	-	-
<b>A10.15</b>	5,83	0,134	83	3548	-	-	-
<b>A10.16</b>	5,83	0,074	158	9550	-	-	-
<b>B10.3</b>	5,55	0,075	54	1820	-	-	-
<b>B10.6</b>	5,98	0,050	263	19498	-	-	-
<b>B10.7</b>	5,95	0,108	120	6166	-	-	-
<b>B10.8</b>	6,16	0,065	-	-	-	122	7943
<b>B10.10</b>	7,17	0,065	214	14454	-	2239	707946
<b>B10.15</b>	6,49	0,060	617	72444	-	-	-
<b>B10.16</b>	6,00	0,111	170	10233	-	-	-
<b>B10.18</b>	6,25	0,076	-	-	-	148	12023
<b>B10.19</b>	6,32	0,086	537	58884	-		16218
<b>B10.20</b>	5,94	0,079	229	16218	-	49	2238

**Tabela 0.54**-Resultados reais e do ComBase para as amostras de carne de Vaca, com contagens positivas de *E.coli*

<i>E.coli</i> (logUFC/g)					ComBase				
	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6	T0
<b>A 10.1</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,85	1,95	0	0,64	2,41	4,28	<0,7 logUFC/g
<b>A10.11</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,85	1,9	0	0,58	2,25	4,04	1,85
<b>A10.13</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,3	0	0,39	1,7	3,21	1,3
<b>A10.15</b>	<0,7 logUFC/g	1	2,16	3,6	0	0,46	1,92	3,55	1
<b>A 10.16</b>	<0,7 logUFC/g	3,06	3,12	3,6	0	0,56	2,2	3,98	3,06

**Tabela 0.55-**Resultados reais do ComBase e do PMP para as amostras de carne de Vaca, com contagens positivas de *S.aureus*

	<b><i>S.aureus</i> (logUFC/g)</b>				<b>ComBase</b>				<b>PMP (Lag)</b>			
	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>
<b>A10.12</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1	0	0,07	0,58	1,63	3,05	3,25	3,76	4,59
<b>A10.13</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,85	0	0,06	0,48	1,41	3,02	3,14	3,48	4,1

**Tabela 0.56-**Resultados reais e do ComBase para as amostras de carne de Porco, com contagens positivas de *E.coli*

	<b><i>E.coli</i> (logUFC/g)</b>				<b>ComBase</b>			
	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>
<b>B5.3</b>	<0,7 logUFC/g	1	1,48	-	-	-	-	-
<b>B10.3</b>	<0,7 logUFC/g	1,6	1,7	2,48	0	0,4	1,73	3,26
<b>B10.4</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,78	2,95	0	0,78	2,75	4,8
<b>B10.6</b>	<0,7 logUFC/g	1,3	1,78	1,85	0	0,64	2,42	4,29
<b>B10.7</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,85	1,9	0	0,51	2,08	3,79
<b>B5.10</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,3	2	-	-	-	-
<b>B10.10</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2,85	2,95	0	0,61	2,33	4,16
<b>B10.15</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2,48	2,6	0	0,8	2,79	4,86
<b>B5.16</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2	2,3	-	-	-	-
<b>B10.16</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2,3	2,6	0	0,57	2,23	4,01
<b>B10.19</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,48	1,78	0	0,77	2,73	4,77
<b>B10.20</b>	<0,7 logUFC/g	3	3,48	>4,18	0	0,62	2,36	4,21



**Tabela 0.57-**Resultados reais do ComBase e do PMP para as amostras de carne de Porco, com contagens positivas de *L.monocytogenes*

	<i>L.monocytogenes</i> (logUFC/g)				ComBase				PMP (Lag)			
	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6
<b>B5.8</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2,3	2,48	0	0,04	0,19	0,59	3,03	3,3	4,13	5,39
<b>B10.8</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2,48	2,78	0	0,4	2,05	3,9	3,03	4,55	7,56	8,99
<b>B5.10</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	2	0	0,07	0,44	1,24	3,02	3,32	4,31	6,02
<b>B10.10</b>	<0,7 logUFC/g	2,79	2,95	3,3	0	0,91	3,35	5,85	3,02	4,72	7,86	9,14
<b>B10.13</b>	<0,7 logUFC/g	3,48	> 4,18	> 4,18	0	0,91	3,35	5,85	3,02	4,39	7,32	8,87
<b>B5.18</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1	0	0,04	0,21	0,64	3,03	3,33	4,24	5,59
<b>B10.18</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,48	2,6	0	0,44	2,17	4,08	3,03	4,69	7,76	9,08
<b>B10.19</b>	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	<0,7 logUFC/g	1,3	0	0,47	2,26	4,21	3,02	4,69	7,76	9,08
<b>B10.20</b>	<0,7 logUFC/g	2	2,3	2,6	0	0,3	1,69	3,35	3,02	4,05	6,69	8,48

Os quadros 5.54, 5.55, 5.56 e 5.57, resumem os principais resultados positivos obtidos e as suas previsões. Dos dois modelos ensaiados aquele que mais se aproximou às contagens reais foi o modelo ComBase. O pior ajustamento do PMP, considerando ou não a fase Lag, a estas amostras, pode ter resultado do fato deste modelo não permitir a introdução de valores de contagem inicial inferiores a 3 logUFC/g, valor, provavelmente, superior ao de todas as amostras. Desta forma, teria sido importante neste trabalho ter conseguido uma maior certeza na determinação da contaminação inicial. Para isso teria sido necessário utilizar uma maior quantidade de amostra na suspensão inicial e efetuar um maior número de placas desta primeira suspensão de modo a conseguir baixar o limite de quantificação. Também convém ressaltar que das 20 amostras de carne de vaca analisadas apenas em 5 se verificaram contagens positivas para *E.coli* e somente em duas para *S.aureus*. Da mesma forma, nas 20 amostras de carne de porco analisadas só em 8 se verificaram contagens positivas para *E.coli* e apenas em 5 para *L.monocytogenes* e só para estas se aplicaram os modelos. Contudo, as contagens iniciais, destes microrganismos, nestas 40 amostras foram todas iguais (<5 UFC/g). Mais uma vez, uma melhor certeza em relação à determinação do valor de contaminação inicial poderia ter permitido obter uma maior concordância entre a realidade e a previsão.

As previsões realizadas pelo ComBase, apesar se terem aproximado melhor à realidade, apresentaram, mesmo assim, de um modo geral, desvios acentuados em relação às contagens reais (quadro 5.58).

**Quadro 0.58**-Valor do quociente entre o número de ufc/g previsto, pelo modelo ComBase e o número de UFC/g determinado pelas análises laboratoriais.

Amostras	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	
	96 horas	144 horas	144 horas	96 horas	144 horas
<b>A10.1</b>	3,6	214,1	-	-	-
<b>A10.11</b>	2,5	138,7			
<b>A10.12</b>			4,3		
<b>A10.13</b>		81,1	0,37		
<b>A10.15</b>	0,6	0,9			
<b>A10.16</b>	0,1	2,4			
<b>B10.3</b>	1,1	6,0			
<b>B10.6</b>	4,4	274,6			
<b>B10.7</b>	1,7	77,1			
<b>B5.8</b>				0,01	0,01
<b>B10.8</b>				0,41	13,2
<b>B5.10</b>					0,17
<b>B10.10</b>	0,3	16,2		2,51	354,9
<b>B10.15</b>	2,0	182,0			
<b>B10.16</b>	0,9	25,7			
<b>B5.18</b>					0,5
<b>B10.18</b>				4,93	30,21
<b>B10.19</b>	17,9	981,4			810,9
<b>B10.20</b>		0,1		0,25	5,62

Na maioria dos casos, o valor estimado superou o valor real (o valor do quociente foi maior que 1). Esta variação de resultados pode ser explicada pelo elevado valor de microrganismos totais a 30°C, que ao crescerem alteram as condições da carne e competem com os microrganismos patogénicos podendo dificultar o seu desenvolvimento. Contudo, em algumas amostras, o valor do quociente aproximou-se de 0, o que significa que o crescimento real superou o crescimento

previsto, o que pode significar que o valor da contaminação inicial real foi maior do que aquele que foi introduzido no *software*. O modelo ComBase parece descrever melhor os resultados às 96 do que às 144 horas, uma vez que os quocientes observados são mais próximos de 1 às 96 horas do que às 144 horas. Em relação à comparação entre os 5 e os 10°C para as amostras com *L. monocytogenes* não se consegue selecionar uma temperatura à qual o modelo possa descrever melhor os dados devido ao reduzido número de amostras com contagens positivas.

Tal como verificado neste estudo, também a aplicação destas ferramentas para efetuar a previsão do crescimento microbiano em cremes de pasteleiro (Duarte, 2011) ou em refeições pré-cozinhadas (Oliveira, 2009) demonstrou uma taxa de crescimento mais elevada do que a taxa real.



## 5. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível observar que a ferramenta preditiva ComBase conseguiu efetuar melhores previsões para o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* em amostras de carne de vaca e de porco do que a ferramenta preditiva PMP. Contudo, mesmo sendo melhor, as previsões efetuadas pelo programa apresentaram desvios em relação às contagens reais, que muito provavelmente se relacionam com a existência da flora de decomposição.

Os piores resultados obtidos com o PMP, que efetuou sempre previsões com taxas de crescimento muito mais elevadas que as observadas em laboratório, podem relacionar-se com as limitações experimentais desta ferramenta. Com efeito, este *software*, assume uma contaminação mínima inicial de 3 logUFC/g e apenas permite a inserção de valores acima de 0,5% de NaCl, valores que se distanciaram dos valores reais. Desta forma, este *software* não demonstrou ser adequado para estas amostras de carne de vaca e de porco.

O ComBase é uma ferramenta mais prática para o utilizador tanto pelo facto de ser menos limitativa, como por permitir realizar a previsão simultânea para mais que um microrganismo e desta forma, possibilita avaliar os resultados de forma mais prática. Este *software*, adequou-se de igual forma para a carne de vaca e porco, tendo, por vezes e especialmente às 96 horas, conseguido aproximar os resultados das suas previsões, aos resultados obtidos em laboratório, em ambos os tipos de carne. Assim, conclui-se que o ComBase demonstrou uma maior aplicabilidade e fiabilidade, sendo mais eficaz nas suas previsões para estas matrizes, que o PMP.

É necessário ter em consideração que as ferramentas preditivas são construídas segundo dados adquiridos em meios de cultura, em condições laboratoriais e como tal, as suas previsões relativamente a situações reais, podem mostrar-se inadequadas. Todavia, o fato das previsões provenientes de ferramentas preditivas, se desviarem das condições reais, não implica que estas sejam defeituosas, mas, provavelmente que o seu conhecimento relativamente aos fatores que influenciam o desenvolvimento microbiano em alimentos se encontra incompleto e que por isto, é necessário continuar a estudar e expandir conhecimentos, para que estes posteriormente, obtenham uma maior aplicabilidade e fiabilidade e permitam ao utilizador, um melhor aproveitamento. Neste contexto, a inserção do valor inicial do número de microrganismos aeróbios totais a 30°C pode permitir uma maior aplicabilidade destas ferramentas às situações reais. As ferramentas preditivas, não demonstram ainda ser completamente fiáveis, não podendo, por isto, ser ainda utilizadas no auxílio de decisões relevantes. Contudo é necessário, como referido anteriormente, continuar a realizar mais estudos e investigações, como esta, de forma a desenvolver e continuar a publicar ferramentas preditivas fiáveis e aplicáveis a situações reais.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAE (2014) Governo de Portugal, disponível em <http://www.asae.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAAA>., acedido em julho 2014.
- Anastácio A (2009) *Segurança e Qualidade Alimentar*. Microbiologia Preditiva Alimentar. Segurança e Qualidade Alimentar 7:56-59.
- ARS.USDA (2014) Pathogen Modeling Program (PMP) Online, disponível em <http://pmp.arserrc.gov/>, acedido em Julho 2014.
- Baptista P, Noronha J, Oliveira J, Saraiva J (2003) *Modelos Genéricos de HACCP*, 1ª edição. Forvisão, Guimarães pp 6-13.
- Bio-Rad (2014a) AL (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium), disponível em <http://www.bio-rad.com/en-br/product/al-agar-listeria-according-ottaviani-agosti-medium-agar>, acedido em Agosto de 2014.
- Bio-Rad (2014b) Rapid'L.mono chromogenic media disponível em <http://www.bio-rad.com/en-pt/product/rapidl-mono-medium>, acedido em Agosto de 2014.
- Bio-Rad (2014c) AL (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium) Agar disponível em <http://www.bio-rad.com/en-mx/product/al-agar-listeria-according-ottaviani-agosti-medium-agar>, acedido a Agosto de 2014.
- Bio-Rad (2014 d) Rapid'L.mono Agar disponível em <http://www.bio-rad.com/de-de/product/rapidl-mono-agar>, acedido em Agosto de 2014.
- Biosystems (2014) Agar Base Baird Parker disponível em <http://www.biosystems.com.br/produto/1438/o-agar-base-baird-parker-e-recomendado-para-isolamento-e-contagem-de-staphylococcus-coagulase-positivos-de-amstras-de-alimentos-e-outros-materiais>, acedido em Agosto de 2014.
- ComBase (2014) disponível em <http://www.combase.cc>, acedido em Julho 2014.
- Cristino J M (2000) *Staphylococcus* in Ferreira W F C, Sousa J C F, *Microbiologia*, Volume 2, Lidel, Lisboa, pp 39-49 (ISBN 972-757-112-3).
- Cruinn Diagnostics Ltd. (2014) Lab M Baird-Parker Medium Base, disponível em <http://www.cruinn.ie/home/Default.aspx?id=1445>, acedido em agosto de 2014.
- D'Amico S, Collins T, Marx J C, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *European Molecular Biology Organization Reports* 7:385-389.
- Duarte J F C (2011) *Contribuição da Microbiologia Preditiva na análise de cremes de pasteleiro*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- EFSA/ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention na Control) (2014) *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*. *European Food Safety Authority Journal* 12:1-312.
- EFSA/ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention na Control) (2013) *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses*,

*Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. European Food Safety Authority Journal* **11**:3129.

- Exposto F (2000) Bacilos Gram Positivos Não Esporulados in Ferreira W F C, Sousa J C F, *Microbiologia*, Volume 2, Lidel, Lisboa, pp 63-69 (ISBN 972-757-112-3).
- Fakruddin M, Mazumder R M, Mannan K S B (2011) Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science* **40**:121-131.
- FDA (2014) Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that influence Microbial Growth, disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>, acedido em Janeiro 2014.
- Heredia N, Wesley I, García S (2009) Microbiologically Safe Foods, Wiley, New Jersey pp 3-11; 115-30; 209-223 (ISBN 978-0-470-05333-1).
- Himedia (2014) Fraser Broth Base Technical Data, disponível em <http://himedia.labs.com/TD/M1327.pdf>, acedido em Agosto de 2014.
- Jay M. James (2000) Modern Food Microbiology: sixth edition. Aspen, Maryland pp.3-8; 39-56 (ISBN 0-387-23180-3).
- Jay M. James, Loessner M J, Golden D A (2005) Modern Food Microbiology: seventh edition. Springer, New York pp 65-80 (ISBN 0-8342-1671)
- Kilcast D, Subramaniam P (2000) The stability and shelf-Life of food. Woodhead, Cambridge pp 1-41.
- Lawley R, Curtis L, Davis J (2008) The food safety hazard guidebook. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Miller F A, Gil M M, Brandão T R S, Silva C L M (2004) A Microbiologia Preditiva como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares. *Boletim de Biotecnologia* **78**:7-12.
- Nakashima S M K, André C D S, Franco B D G M (2000), Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva, *Brazilian Journal of Food Technology*, **3**:41-51.
- Novais R M (1998) Microbiologia dos Alimentos in in Ferreira W F C, Sousa J C F, *Microbiologia*, Volume 1, Lidel, Lisboa, pp 297-310 (ISBN 972-757-024-0).
- Oliveira F M (2009) Evolução da carga microbiológica de uma refeição pré-cozinhada- Resultados experimentais e Microbiologia Preditiva. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, Universidade de Aveiro-Departamento de Química.
- Oxoid (2014a) Tryptone Bile X-glucuronide Medium, disponível em [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0945&org=71&c=uk&lang=en](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0945&org=71&c=uk&lang=en), acedido em Agosto de 2014.
- Oxoid (2014b) Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth, disponível em [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0669&org=124&c=uk&lang=EN](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0669&org=124&c=uk&lang=EN), acedido em Agosto de 2014.
- Pampulha E M (1998) Nutrição e Crescimento de Microrganismos in Ferreira W F C, Sousa J C F, *Microbiologia*, Volume 1, Lidel, Lisboa, pp 81-98 (ISBN 972-757-024-0).



- PVL (2014) TBX Agar disponível em [http://www.pvl.pt/pt/produto/38\\_59+436/tbx-agar-em-frasco-bm069/](http://www.pvl.pt/pt/produto/38_59+436/tbx-agar-em-frasco-bm069/), acedido em Agosto de 2014.
- Regulamento (CE) nº 1441/2007 Da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.o 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia L322/12-L322/29.
- Rodríguez F P, Valero A (2013), Predictive Microbiology in Foods.Springer, London pp.1-9; 25-54; 75-85 (ISBN 978-1-4614-5520-2).
- Roszak D.B, Colwell R.R (1987) Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment, Microbiological Reviews 51:365-379.
- Sousa J C F (2000) Enterobacteriaceae Esporulados in Ferreira W F C, Sousa J C F, *Microbiologia*, Volume 2, Lidel, Lisboa, pp 99-109 (ISBN 972-757-112-3).



## 7. ANEXOS

**Quadro 7.1**-Resultados de  $a_w$ , pH, NaCl (%), para as amostras de carne de vaca.

Nº Amostra	$a_w$	pH	NaCl (%)
A5.1/ A10.1	0,870	6,32	0,101
A5.2/ A10.2	0,885	5,75	0,148
A5.3/ A10.3	0,875	5,77	0,180
A5.4/ A10.4	0,884	5,73	0,146
A5.5/ A10.5	0,864	5,92	0,135
A5.6/ A10.6	0,820	5,51	0,140
A5.7/ A10.7	0,831	6,06	0,105
A5.8/ A10.8	0,877	6,04	0,141
A5.9/ A10.9	0,885	6,08	0,158
A5.10/ A10.10	0,882	5,89	0,141
A5.11/ A10.11	0,898	5,86	0,081
A5.12/ A10.12	0,944	5,92	0,146
A5.13/ A10.13	0,814	5,68	0,126
A5.14/ A10.14	0,912	5,79	0,120
A5.15/ A10.15	0,862	5,83	0,134
A5.16/ A10.16	0,818	5,83	0,074
A5.17/ A10.17	0,808	5,69	0,096
A5.18/ A10.18	0,843	5,63	0,158
A5.19/ A10.19	0,904	5,58	0,133
A5.20/ A10.20	0,820	5,54	0,080

**Quadro 7.2-**Resultados de aw, pH, NaCl (%) para as amostras de carne de porco

Nº Amostra	a <sub>w</sub>	pH	NaCl (%)
B5.1/ B10.1	0,837	6,55	0,100
B5.2/ B10.2	0,821	5,93	0,07
B5.3/ B10.3	0,913	5,55	0,075
B5.4/ B10.4	0,882	6,36	0,063
B5.5/ B10.5	0,836	6,11	0,131
B5.6/ B10.6	0,835	5,98	0,05
B5.7/ B10.7	0,907	5,95	0,108
B5.8/ B10.8	0,847	6,16	0,065
B5.9/ B10.9	0,818	6,15	0,069
B5.10/ B10.10	0,841	7,17	0,065
B5.11/ B10.11	0,831	6,05	0,083
B5.12/ B10.12	0,794	5,89	0,062
B5.13/ B10.13	0,829	6,10	0,041
B5.14/ B10.14	0,877	6,35	0,073
B5.15/ B10.15	0,864	6,49	0,06
B5.16/ B10.16	0,845	6,00	0,111
B5.17/ B10.17	0,790	5,82	0,073
B5.18/ B10.18	0,914	6,25	0,076
B5.19/ B10.19	0,902	6,32	0,086
B5.20/ B10.20	0,797	5,94	0,079

**Quadro 7.3**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T0 (NA-nº amostra; \*-*Salmonella* negativa em 10g)

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A5.1	0	0				A5.8	0	0				A5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			20	3		2E+3			66	6		7E+3			68	6		7E+3
<i>E.coli</i>	A5.2	0	0				A5.9	0	0				A5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			36	9		4E+3			70	9		7E+3			20	3		2E+3
<i>E.coli</i>	A5.3	0	0				A5.10	0	0				A5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*	0			
Totais a 30°C			30	3		3E+3					47	5E+5		50	5			5E+2
<i>E.coli</i>	A5.4	0	0				A5.11	0	0				A5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C				63	6	6E+4			30	3		3E+3					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.5	0	0				A5.12	0	0				A5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			30	1		3E+3			21	3		2E+3			63	6		6E+3
<i>E.coli</i>	A5.6	0	0				A5.13	0	0				A5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C		60	6			6E+2			120	10		1E+4			120	10		1E+4
<i>E.coli</i>	A5.7	0	0				A5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>		*						*										
Totais a 30°C		30	3			3E+2		90	8			9E+2						

**Quadro 7.4**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T2, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A5.1	0	0				A5.8	0	0				A5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					238	2,38E+6				170	16	1,69E+5
<i>E.coli</i>	A5.2	0	0				A5.9	0	0				A5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4			77	7		8E+3					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.3	0	0				A5.10	0	0				A5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					204	2,04E+6					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.4	0	0				A5.11	0	0				A5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					148	1,48E+6					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.5	0	0				A5.12	0	0				A5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					168	1,68E+6
<i>E.coli</i>	A5.6	0	0				A5.13	0	0				A5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					276	2,76E+6					>300	>300E+4					210	2E+6
<i>E.coli</i>	A5.7	0	0				A5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>								*										
Totais a 30°C					>300	>300E+4		90	8			9E+2						

**Quadro 7.5-**Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T2, a 10°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A10.1	0	0				A10.8	0	0				A10.15	1	0			1,00E+1
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.2	0	0				A10.9	0	0				A10.16	116	11			1,15E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.3	0	0				A10.10	0	0				A10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					216	2,16E+06					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.4	0	0				A10.11	0	0				A10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.5	0	0				A10.12	0	0				A10.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.6	0	0				A10.13	0	0				A10.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.7	0	0				A10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.6-**Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*., microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T4, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A5.1	0	0				A5.8	0	0				A5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.2	0	0				A5.9	0	0				A5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.3	0	0				A5.10	0	0				A5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.4	0	0				A5.11	0	0				A5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.5	0	0				A5.12	0	0				A5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.6	0	0				A5.13	0	0				A5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.7	0	0				A5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						



**Quadro 7.7-**Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T4, a 10°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A10.1	7	0			7,00E+1	A10.8	0	0				A10.15	14	2			1,45E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.2	0	0				A10.9	0	0				A10.16	140	5			1,32E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.3	0	0				A10.10	0	0				A10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.4	0	0				A10.11	7	0			7,00E+1	A10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.5	0	0				A10.12	0	0				A10.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.6	0	0				A10.13	0	0				A10.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.7	0	0				A10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.8-**Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T6, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A5.1	0	0				A5.8	0	0				A5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.2	0	0				A5.9	0	0				A5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.3	0	0				A5.10	0	0				A5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.4	0	0				A5.11	0	0				A5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.5	0	0				A5.12	0	0				A5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.6	0	0				A5.13	0	0				A5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A5.7	0	0				A5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.9**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de vaca, no T6, a 10°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	A10.1	9	0			9E+1	A10.8	0	0				A10.15	0	40			4E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.2	0	0				A10.9	0	0				A10.16	0	39			4E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.3	0	0				A10.10	0	0				A10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.4	0	0				A10.11	8	0			8E+1	A10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.5	0	0				A10.12	0	0				A10.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					1	0			1E+1		0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.6	0	0				A10.13	2	0			2E+1	A10.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					7	0			7E+1		0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	A10.7	0	0				A10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.10**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T0 (NA-nº amostra; \*-*Salmonella* negativa em 10g).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B5.1	0	0				B5.8	0	0				B5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			60	6		6E+3					192	2E+6				120	21	1E+5
<i>E.coli</i>	B5.2	0	0				B5.9	0	0				B5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			31	3		3E+3					>300	>300E+4				65	6	6E+4
<i>E.coli</i>	B5.3	0	0				B5.10	0	0				B5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			120	20		1E+4				120	10	1E+5				35	3	3E+4
<i>E.coli</i>	B5.4	0	0				B5.11	0	0				B5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					64	6E+5
<i>E.coli</i>	B5.5	0	0				B5.12	0	0				B5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C					60	6E+5					32	3E+5					63	6E+5
<i>E.coli</i>	B5.6	0	0				B5.13	0	0				B5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>		*						*						*				
Totais a 30°C			120	10		1E+4			54	6		5E+3					32	3E+5
<i>E.coli</i>	B5.7	0	0				B5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>		*						*										
Totais a 30°C				32	3	3E+4					196	2E+6						

**Quadro 7.11**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T2, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B5.1	0	0				B5.8	0	0				B5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.2	0	0				B5.9	0	0				B5.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.3	1	0			1E+1	B5.10	0	0				B5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.4	0	0				B5.11	0	0				B5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.5	0	0				B5.12	0	0				B5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.6	0	0				B5.13	0	0				B5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.7	0	0				B5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.12-** Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T2, a 10°C (NA-nº amostra)

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B10.1	0	0				B10.8	0	0				B10.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.2	0	0				B10.9	0	0				B10.16	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.3	4	0			4E+1	B10.10	0	0				B10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					60	6			6E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.4	0	0				B10.11	0	0				B10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.5	0	0				B10.12	0	0				B10.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.6	2	0			2E+1	B10.13	0	0				B10.20	100	11			1E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	33			3E+3		10	1			1E+2
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.7	0	0				B10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.13**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T4, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B5.1	0	0				B5.8	0	0				B5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					19	2			2E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.2	0	0				B5.9	0	0				B5.16	11	1			1E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.3	3	0			3E+1	B5.10	2	0			2E+1	B5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.4	0	0				B5.11	0	0				B5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.5	0	0				B5.12	0	0				B5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.6	0	0				B5.13	0	0				B5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.7	0	0				B5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

**Quadro 7.14**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T4, a 10°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B10.1	0	0				B10.8	0	0				B10.15	30	3			3E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					30	3			3E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.2	0	0				B10.9	0	0				B10.16	20	1			2E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.3	5	0			5E+1	B10.10	70	7			7E+2	B10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					90	9			9E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.4	6	0			6E+1	B10.11	0	0				B10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					3	0			3E+1
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.5	0	0				B10.12	0	0				B10.19	3	0			3E+1
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.6	6	0			6E+1	B10.13	0	0				B10.20		33			3E+3
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	>150			>150E+2		20	2			2E+2
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.7	7	0			7E+1	B10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						



**Quadro 7.15**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T6, a 5°C (NA-nº amostra).

MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B5.1	0	0				B5.8	0	0				B5.15	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					30	3			3E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.2	0	0				B5.9	0	0				B5.16	24	2			2E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.3	-	-				B5.10	10	1			1E+2	B5.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					10	1			1E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.4	0	0				B5.11	0	0				B5.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					1	0			1E+1
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.5	0	0				B5.12	0	0				B5.19	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.6	0	0				B5.13	0	0				B5.20	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B5.7	0	0				B5.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						

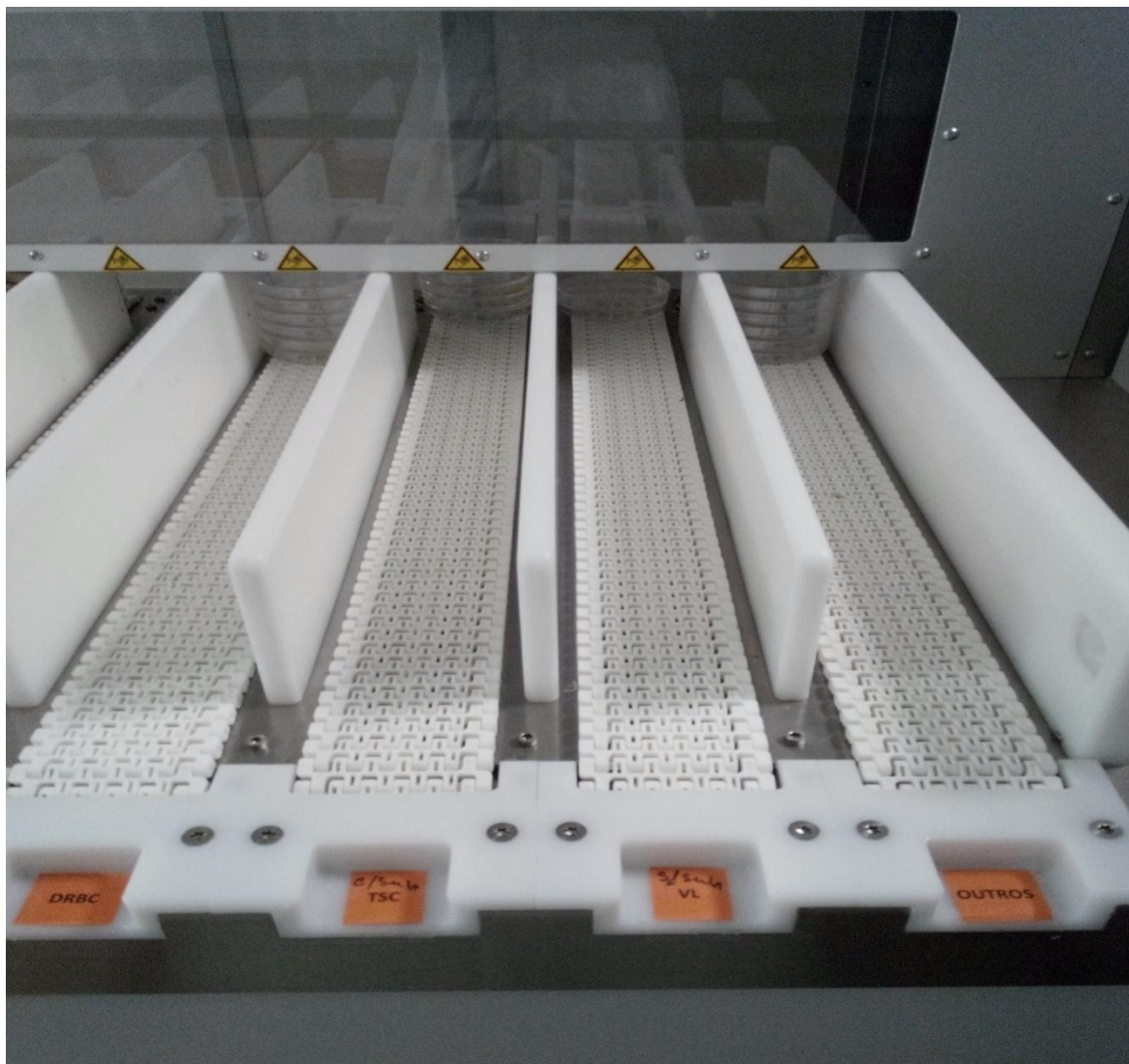
-)Não determinado.

**Quadro 7.16**-Resultados, em UFC/g, da contagem de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e pesquisa de *Salmonella*, em 20 amostras de carne de porco, no T6, a 10°C (NA-nº amostra).

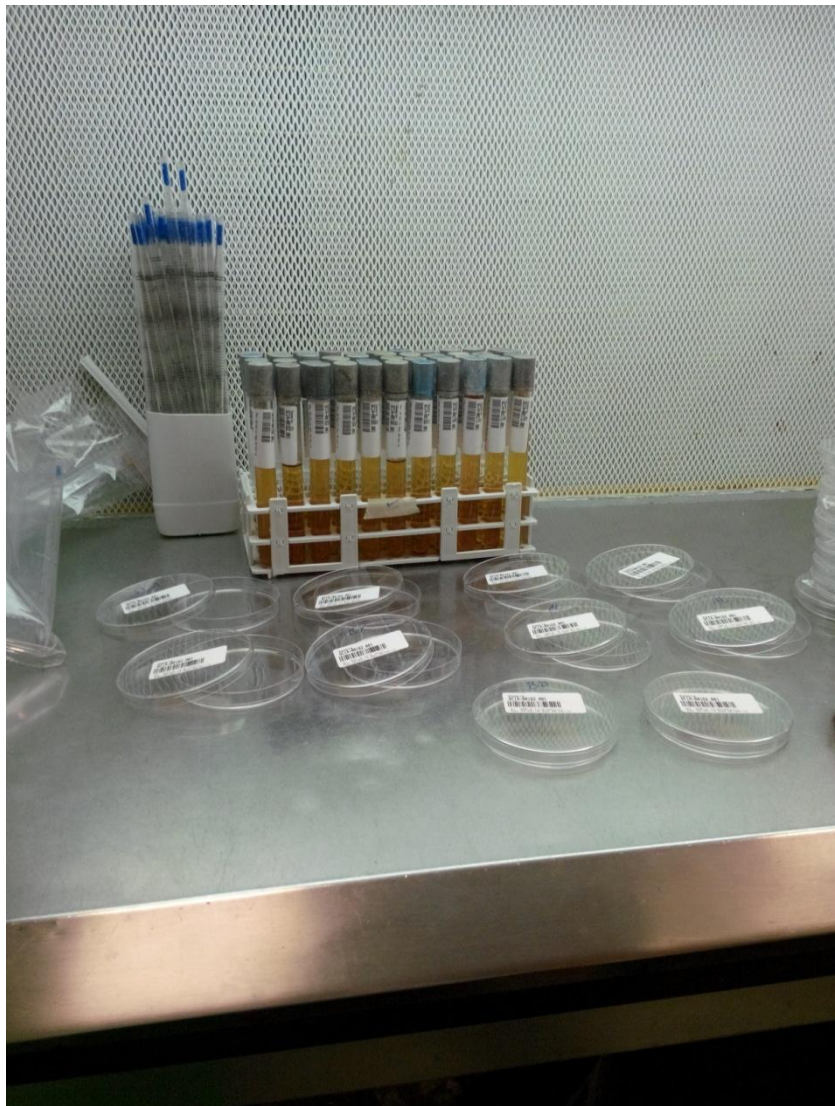
MO	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL	NA	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	TOTAL
<i>E.coli</i>	B10.1	0	0				B10.8	0	0				B10.15	42	4			4E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					65	6			6E+2		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.2	0	0				B10.9	0	0				B10.16	41	3			4E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.3	29	3			3E+2	B10.10	90	9			9E+2	B10.17	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0						18			2E+3		0	0			
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.4	85	9			9E+2	B10.11	0	0				B10.18	0	0			
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					42	4			4E+2
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.5	0	0				B10.12	0	0				B10.19	6	0			6E+1
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0					2	0			2E+1
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.6	7	0			7E+1	B10.13	0	0				B10.20		>150			>150E+2
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0					0	0			
<i>L.monocytogenes</i>		0	0						>150			>150E+2		40	4			4E+2
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4					>300	>300E+4
<i>E.coli</i>	B10.7	8	0			8E+1	B10.14	0	0									
<i>S.aureus</i>		0	0					0	0									
<i>L.monocytogenes</i>		0	0					0	0									
<i>Salmonella</i>																		
Totais a 30°C					>300	>300E+4					>300	>300E+4						



**Figura 7.1-Equipamento KITTY**

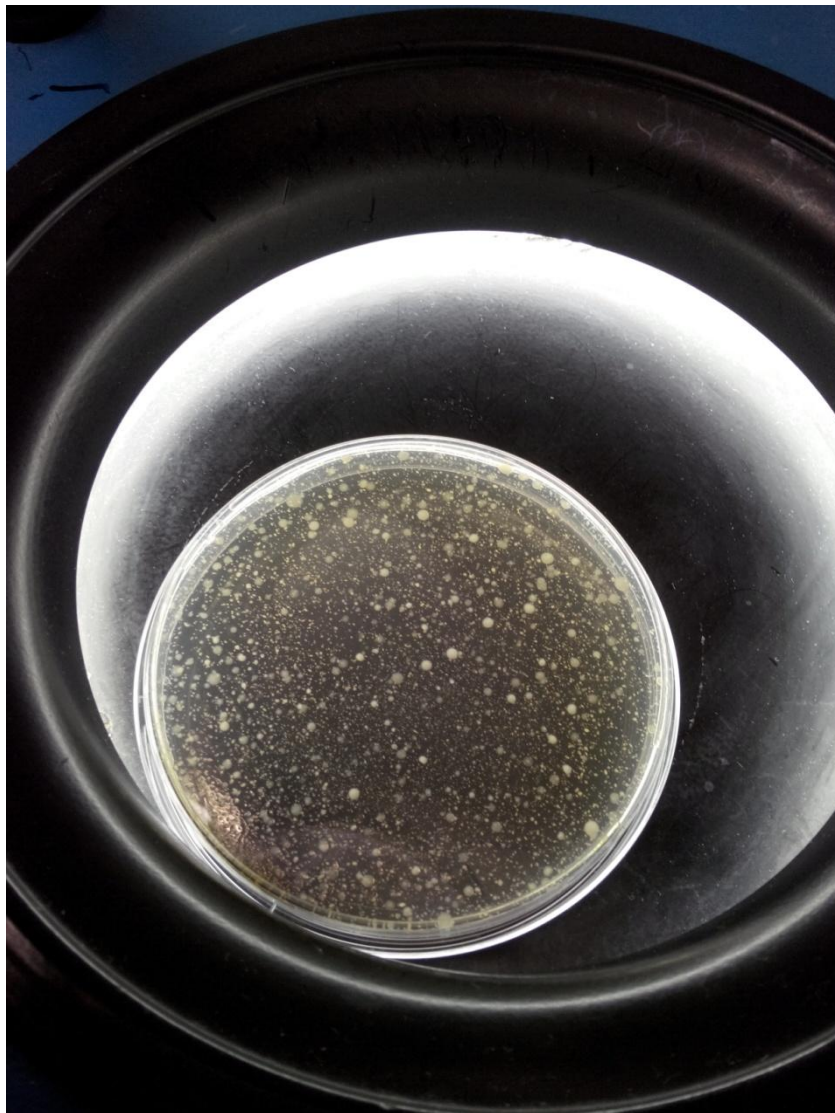


**Figura 7.2-saída de placas do equipamento KITTY**

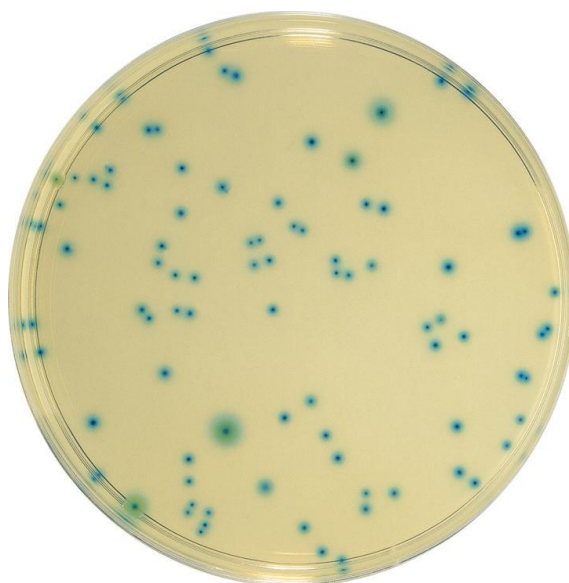


**Figura 7.3**-Amostras de carne de porco, já diluídas em BPW e respectivas placas, para posterior contagem de *S.aureus*





**Figura 7.4**-Exemplo de placa de PCA, para contagem de microrganismos totais a 30°C



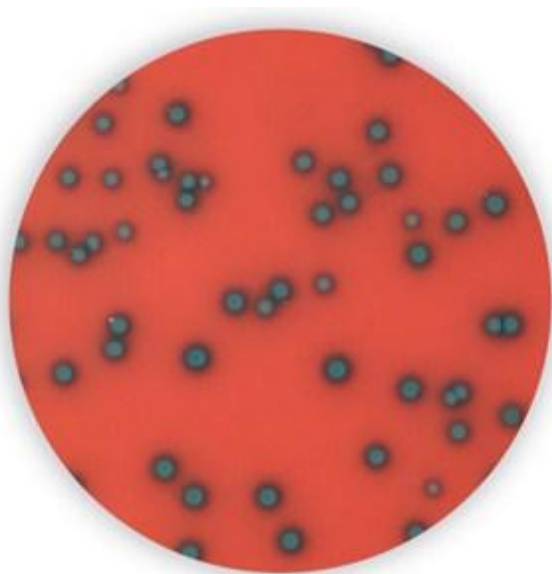
**Figura 7.5**-Exemplo de placa de TBX, com crescimento de colônias típicas de *E.coli* (PVL, 2014)



**Figura 7.6**-Exemplo de placa de BPM+RPF, com crescimento de colônias típicas de *S.aureus* (Biosystems 2014)



**Figura 7.7**-Exemplo de placa de AL, com crescimento de colônias típicas de *L.monocytogenes* (Bio-Rad, 2014 c)



**Figura 7.8**-Exemplo de placa de RLM,com crescimento de colônias típicas de *L.monocytogenes* (Bio-Rad,2014d)